



MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA
FIBROSE CÍSTICA: MÉTODOS CLÁSSICOS E NOVAS
PERSPECTIVAS**

***CLINICAL AND LABORATORIAL DIAGNOSIS OF CYSTIC
FIBROSIS: CLASSICAL METHODS AND NEW
PERSPECTIVES***

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA FIBROSE CÍSTICA:
MÉTODOS CLÁSSICOS E NOVAS PERSPECTIVAS**

***CLINICAL AND LABORATORIAL DIAGNOSIS OF CYSTIC FIBROSIS:
CLASSICAL METHODS AND NEW PERSPECTIVES***

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Thesis presented to the Post-Graduation of the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfilment of the requirements for the Doctor degree, in the area of Children and Teenager Health.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

Co-Orientadores: Prof. Dr. Jose Dirceu Ribeiro

Prof. Dr. Francisco Ubaldo Vieira Júnior

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Maria de Fátima Corrêa Pimenta Servidoni e orientada pelo orientador Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

CAMPINAS

2014

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

Se69d Servidoni, Maria de Fátima Corrêa Pimenta, 1961-
Diagnóstico clínico e laboratorial da fibrose cística :
métodos clássicos e novas perspectivas / Maria de Fátima
Corrêa Pimenta Servidoni. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Antônio Fernando Ribeiro.
Coorientador : Jose Dirceu Ribeiro.
Coorientador : Francisco Ubaldo Vieira Júnior.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eletrofisiologia. 2. Cloro. 3. Biópsia 4. Suor. 5.
Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística.
I. Ribeiro, Antônio Fernando, 1948-. II. Ribeiro, Jose Dirceu,
1952-. III. Vieira Júnior, Francisco Ubaldo. IV. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Clinical and laboratorial diagnosis of cystic fibrosis: classical methods and new perspectives

Palavras-chave em inglês:

Electrophysiology

Chlorine

Biopsy

Sweat

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Antônio Fernando Ribeiro [Orientador]

Maria Angélica Pinheiro Santos Santana

Giesela Fleisher Ferrari

Elizete Aparecida Lomazi

Ciro Garcia Montes

Data da defesa: 21-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI

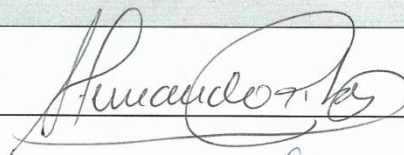
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANTONIO FERNANDO RIBEIRO

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO

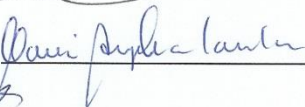
Coorientador (a) PROF(A). DR(A). FRANCISCO UBALDO VIEIRA JÚNIOR

MEMBROS:

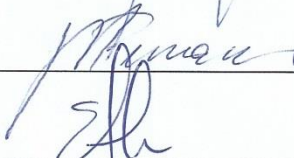
1. PROF(A). DR(A). ANTONIO FERNANDO RIBEIRO



2. PROF(A). DR(A). MARIA ANGÉLICA PINHEIRO SANTOS SANTANA



3. PROF(A). DR(A). GIESELA FLEISHER FERRARI



4. PROF(A). DR(A). ELIZETE APARECIDA LOMAZI



5. PROF(A). DR(A). CIRO GARCIA MONTES



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 21 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pacientes portadores de FC (fibrose cística) que são a razão deste estudo, que de forma tão corajosa convivem diariamente com a doença e, mesmo assim, não se cansam de colaborar com todos os ensaios propostos, confiantes e esperançosos. Acreditam que de verdade buscamos o tratamento eficiente e a cura da FC. Obrigada por me inspirarem a prosseguir todos os dias!

EPÍGRAFE

“Vamos confiar mais em Deus e obedecer às Suas magnânimas leis. Se trabalharmos em favor do Bem, esse Bem virá ao nosso encontro, esta é a lei.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor,

Aos anjos que o Senhor colocou em minha vida...e são muitos:

Prof. Dr. Roberto Jarbas de Toledo (*in memorian*) - meu mestre amado, que sempre acreditou nas pessoas. Apaixonado pelos nossos pacientes e pela Disciplina de Gastropediatria-FCM-UNICAMP. Um exemplo a ser seguido. Sei que onde estiver, está feliz!

Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro - meu orientador e amigo querido, que me acolheu na FC, me permitiu crescer, amadurecer. Sempre usou de sabedoria com mansidão para me conduzir. Por isso: cheguei até aqui!

Prof. Dr. Jose Dirceu Ribeiro e Prof. Dra. Maria Ângela Ribeiro - não poderia deixá-los separados. Que bela dupla! São meus anjos da guarda de cabeceira. Cuidam de cada detalhe do dia-a-dia, e, acima de tudo me amam. Obrigada por toda a orientação com amor e cuidado. Sem vocês eu não conseguiria!

Prof. Dra. Margarida Amaral e Prof. Dra. Marisa Isabel Lopes de Sousa - anjos que vêm da província portuguesa, trazendo inovação e garra. Margarida: obrigada por estar conosco; o tempo todo propondo parcerias sem distinção. Obrigada por confiar e estimular-nos com amor. Marisa: obrigada por ser parceira e grande amiga; destrinchar as barreiras com destemor e amor. Meu anjo irmã de cada momento bom ou ruim. Com vocês pude chegar até aqui!

Prof. Dr. Francisco Ubaldo Vieira Jr. - chegou depois, mas com tanto entusiasmo e dedicação que parece estar desde o início. Obrigada por atender ao convite. Com você o trajeto ficou mais fácil, eu pude cumprir o prazo!

Prof. Dra. Adyleia minha querida, muito obrigada pela disposição, conselhos, cobertura e parceria generosa. Poder contar com você fez toda a diferença!

Meus queridos amigos anjos: Silvia, Carla e Fernando Marson, que belo trio! Trabalham em separado, mas em conjunto. Somam esforços, cada um em uma frente. Tornaram esta jornada possível, leve e divertida!

Prof. Giesela, Prof. Angélica, Prof. Elizete e Prof. Ciro admiro muito cada um de vocês. Obrigada por aceitarem o convite. Obrigada por me conduzirem nesta passagem.

Ao anjo Gabriel e demais amigos da Disciplina de Gastroped: Adriana, Ângela, Prof. Collares, Negrão, Roberta e Roberto poder trabalhar com vocês é compartilhar e crescer todos os dias. Anjos que me ajudam a vencer com sapiência!

Anjos do CCA (Centro Cirúrgico Ambulatorial). Vocês me ajudam a caminhar todos os dias, a cumprir a missão! Sem vocês eu e Sílvia de nada serviríamos. Obrigada por nos ajudarem a construir esta história...

Anjos do Gastrocentro: Ciro, Fábio, Prof. Nelson, Claudio, Dona Fafá, Martins, Lucia, Claudete, Stelinha, Marilu, Rose, Rosângela, Elaine, Júlio, Gabi, Mariana, Juliana, Eliana, Jiane e toda a equipe de enfermagem, amigos queridos. Anjos sem asas. Sexta-feira é o dia mais legal da semana. Onde toda a minha performance é testada. Passo do idoso pra criança em um segundo. Da colono pra endoscopia em outro. O apoio, carinho e amizade são a fonte que me reabastece todos os dias. Obrigada por me aceitarem no time, mesmo sendo pediatria! Por me ajudarem a caminhar todos os dias com humor, bolinho de chuva, almoço e tantas outras coisas. Amo vocês. Obrigada!

Aos amigos do CIPED: Adriana, Lucas, Rosa, Juliana, Silvana, Arthur e da Genética: Carmem e Luciana - anjos de apoio. Sem vocês o caminho seria tortuoso. Muito obrigada por abrandarem meu caminho!

Existem pessoas que mesmo sem saber nos ajudam, são anjos sem saber: Marcia da pós, Prof. Lília, Prof. Marcos Nolasco, Prof. Marluce e Maura. Foram momentos pontuais, mas fundamentais. Cada qual de uma forma especial. Muito obrigada meus queridos. Anjos especiais!

Obrigada anjos parceiros Sílvia e Sissi, sempre tranquilas e confiantes, amigas acima de tudo. Obrigada pelo carinho e amizade. Anjos amigos de todos os dias!

Aos anjos amigos de longe que torcem, estimulam e no fundo estão sempre perto: Adelaide, Daniela, Sheila, Érica, Cristina, Ique, Clara, Clarisse, Rose, Luíz, Helga e tantos outros que posso estar esquecendo agora, mas que têm um lugar em meu coração. Obrigada! São anjos de sonhos também...

A minha família em geral, porque sei que todos torcem de verdade por mim e compartilham da minha alegria- Obrigada pelas orações e amor. Vocês são anjos de intercessão.

Meus pais Pimenta e Lili que sempre acreditaram que era possível eu ser doutora de novo. A primeira e segunda vez na nossa família. A vós papai que nunca me tratou diferente por ser menina, e a vós mamãe, que por ser menina, sempre achou que eu podia mais. Pelo amor incondicional! O meu muito obrigado com carinho, amor e admiração!

Aos amores da minha vida: Marcelo, Pedro e Rebeca. Por me permitirem ser além de esposa e mãe; médica, aluna e pesquisadora. Por compreenderem que a medicina é o meu outro

amor, dividindo com ela a minha pessoa, com estímulo, compreensão e carinho. Cheguei até aqui por vocês. Sem vocês nada disso teria graça! São meus anjos de amor....

Aos amigos que esqueci de agradecer nominalmente, mas que sabem que isso não tem a menor importância. Se você está aqui, é porque você é importante pra mim e se esqueci de convidar e você gostaria de ter estado, com certeza também tem um lugar no meu coração.

À todos vocês: MUITO OBRIGADA!

PREFÁCIO

Esse trabalho é fruto de uma colaboração entre Portugal, Alemanha e Brasil na área de eletrofisiologia para diagnóstico de fibrose cística, em busca da cura.

Trabalhar em equipe é desafiador, uma arte que devemos aprender a valorizar e cultivar. Para mim foi uma dádiva. Transformou minha vida e quem sabe pode vir a transformar muitas outras também.

SUMÁRIO

PÁGINAS

DEDICATÓRIA	vii
EPÍGRAFE	ix
AGRADECIMENTOS	xi
PREFÁCIO	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
ABBREVIATIONS	xxi
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUÇÃO	29
I. Histórico	31
II. Métodos de Diagnóstico da Fibrose Cística	42
1. Fenótipo	43
2. Triagem neonatal	44
3. Teste do Suor	46
4. Diferença de Potencial Nasal (DPN)	49
5. Avaliação eletrofisiológica da CFTR em biópsia retal por câmara de <i>Ussing</i>	51
6. Evaporímetro	58
7. Caracterização genética da FC: o gene CFTR	63
III. A proteína CFTR	68
2. OBJETIVOS	71
3. CAPÍTULOS	75
3.1. Capítulo 1: Measurements of CFTR-mediated Cl ⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis	77
3.1.1 Summary	77
3.1.2 Introduction	78
3.1.3 Methods	80
3.1.4 Results	87
3.1.5 Discussion	101
3.1.6 References	107
3.2. Capítulo 2: Rectal Forceps Biopsy Procedure in Cystic Fibrosis: Technical Aspects and Patients Perspective for Clinical Trials Feasibility	112
3.2.1 Summary	112
3.2.2 Introduction	113

3.2.3	Methods	114
3.2.4	Results	122
3.2.5	Discussion	131
3.2.6	References	134
3.3.	Capítulo 3: Estimulação, Coleta e Dosagem de Eletrólitos no Teste do Suor: Características de Diferentes Centros.....	137
3.3.1	Sumário	137
3.3.2	Introdução.....	138
3.3.3	Métodos.....	140
3.3.4	Resultados	142
3.3.5	Discussão.....	154
3.3.6	Referências	156
4.	DISCUSSÃO & CONCLUSÃO	159
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS & PERSPECTIVAS	165
6.	REFERÊNCIAS GERAIS.....	169
7.	APÊNDICES	181
8.	ANEXOS	203

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência de Vigilância Nacional
AMPc	Adenosina 5-monofosfato cíclico
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
<i>Borderline</i>	valores duvidosos ou limítrofes
Ca^{2+}	Ião Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>CBC</i>	Complexo <i>Burkholderia Cepacia</i>
CCA	Centro Cirúrgico Ambulatorial
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
Cl^-	Ião Cloro ou Cloreto
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFTR- Cl^-	CFTR como canal de Cloreto
CFTR-RD	Doenças relacionadas a CFTR
CBAVD	Ausência congênita bilateral dos vasos deferentes
CIPED	Centro de Investigação em Pediatria
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
CO_2	Dióxido de Carbono
<i>Cut-off</i>	Determina o limite para dizer se um exame é positivo ou negativo
DIOS	Síndrome da obstrução intestinal distal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPN	Diferença de Potencial Nasal
DPOC	Doença obstrutiva respiratória crônica
ENaC	Canal epitelial de Sódio – <i>Epithelial Sodium Channel</i>
eqI_{cc}	Corrente de curto circuito equivalente
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HC	Hospital de Clínicas
HCO_3^-	Bicarbonato
$\text{I}_{\text{aplicada}}$	Corrente aplicada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
I_{cc}	Corrente de curto-circuito
ID	Intradérmica

IFSP	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
IM	Íleo meconial
IRT	Tripsinogênio imunoreativo
IP	Insuficiência Pancreática
K ⁺	Iôn Potássio
LAFIC	Laboratório de Investigação em FC
LAFIP	Laboratório de Investigação em Pediatria
mEq/L	Mili-equivalente por litro
MG	Minas Gerais (estado)
Min.	Minuto
mmol/L	Mili-mol por litro
MS	Ministério da Saúde
Na ⁺	Iôn Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POP	Procedimento de Operação Padrão
RN	Recém-nascidos
RNA _m	Ácido ribonucleico (RNA) mensageiro
R _{te}	Resistência transepitelial
SAFC	Sociedade de Apoio aos pacientes FC
SK (escore)	Escore de Shwachman-Kulczycki
SP	São Paulo (Estado)
SUFRAMA	Superintendência da Zona Franca de Manaus
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNN	Triagem Neonatal
TS	Teste do Suor
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo.
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V _{te}	Tensão/voltagem transepitelial
WHO	<i>World Health Organization</i>

ABBREVIATIONS

AACB	Australasian Association of Clinical Biochemists
ABC	ATP-binding cassette
ABPA	Allergic bronchopulmonary aspergillosis
ALI	Air liquid interface
Amil	Amiloride
ATP	Adenosine 5'Triphosphate
BAL	Broncho-alveolar lavage
BMI	Body mass index
Ca ²⁺	Calcium ion
CaCC	Calcium-activated Chloride Channel
cAMP	cyclic Adenosine 5'Monophosphate
CBAVD	Congenital bilateral absence of the vas deferens
CCH	Carbachol
CF	Cystic fibrosis
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<i>CFTR</i>	Gene encoding CFTR
CFTR-RD	CFTR-Related disorders
CF-RDM	CF-related diabetes mellitus
CFWW	CF World Wild
Cl ⁻	Chloride ion
[Cl ⁻]	Chloride ion concentration
CV	Coefficient of variation
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DIOS	Distal intestinal obstruction syndrome
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ENaC	Epithelium Sodium Channel
ER	Endoplasmic Reticulum
EWGCF	European Working Group on CF
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FEE	Fecal Elastase E1

FEV ₁	Forced expiratory volume in first second
Fsk	Forskolin
FVC	Forced vital capacity
h	hours
H ⁺	Hydrogen ion
HBE	Human Bronchial Epithelial cells
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
HE	Heamatoxin-Eosin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N-(2-ethanesulphonic acid)
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
Indo	Indomethacin
IRT	Imunoreactive trypsinogen
I _{sc}	Short-circuit current
K ⁺	Potassium ion
MI	Meconium ileus
MSD	Membrane-spanning domain
min	minute
mo	months
Na ⁺	Sodium ion
NACFC	North American Cystic Fibrosis Conference
NBD	Nucleotide binding domain
n.c.	Negative control
NCCLS	US National Committee for the Clinical Laboratory Standards
NPD	Nasal Potential Difference
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Pancreatic Insufficiency
PS	Pancreatic Sufficiency
RD	Regulatory domain
RT	Room Temperature
R _{te}	Transepithelial resistance
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standard Error of the Mean
STD	Standard Deviation
SK (score)	Shwachman-Kulczycki (score)
SOP	Standardized operating procedure

SPD	Sweat potential difference
ST	Sweat test
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane- hydrochloric acid
USA	United States of America
VX-770	N-(2, 4-Di-tert-butyl-5-hydroxyphenyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide
VX-809	3-{6-{[1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-yl)cyclopropanecarbonyl]amino}-3-methylpyridin-2-yl}benzoic acid
V _{te}	Transepithelial voltage
% v/v	Percentage expressed in volume/volume
WB	Western blot
wt-CFTR	Wild-type CFTR
% w/v	Percentage expressed in weight/volume
yrs	Years

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, comum em caucasianos. Tem incidência de 1: 2.500 a 1: 6.000 nascidos vivos e 1: 25 em portadores sãos na Europa e EUA e no Brasil a incidência estimada é de 1:10.000 nascidos vivos. É causada pela presença de dois genes *CFTR* (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) mutados, que codificam uma proteína também denominada CFTR. A CFTR é o principal canal de Cloro (Cl⁻), é expressa na membrana apical das células epiteliais dos tratos respiratório e digestório (pâncreas, fígado e intestino), nas glândulas sudoríparas e salivares, e no aparelho reprodutor masculino. Regula o transporte de íons e de água.

O comprometimento ou a ausência da função da CFTR promove a desidratação das mucosas com produção de um muco viscoso com consequente obstrução das vias respiratórias e ductos das glândulas exócrinas determinando o fenótipo da FC. O grau de função da CFTR será determinante da gravidade da doença.

Até à data, já foram descritas cerca de 2000 mutações no gene *CFTR*. A F508del é a mutação mais prevalente, está presente em 85% dos pacientes a nível mundial e em 65% no Brasil. As mutações podem ser classificadas em 6 grupos de acordo com o defeito molecular e celular e determina o fenótipo da FC. Pode ser classificado em: clássico e não clássico. O clássico é o mais conhecido e frequente e apresenta sintomas graves. O não clássico ocorre em cerca de 15% dos doentes e apresenta sintomas mais brandos, com diagnóstico em geral complexo e tardio.

A FC é assim um “espectro de doenças” e o seu rastreio precoce na triagem neonatal (TNN), antes mesmo dos primeiros sintomas, abre novas perspectivas de prognóstico por isso é emergente a necessidade de métodos acurados que determinem a função da CFTR, direcionando uma terapia individualizada, em busca da cura.

A primeira parte deste trabalho procurou consolidar a medição da função do canal CFTR em biopsias retais como um marcador biológico para diagnóstico e prognóstico da FC; a segunda descreveu a realização da biópsia retal e suas particularidades sob a ótica dos pacientes e da técnica. A terceira abordou a realização do teste do suor (TS) no estado de São Paulo (SP) expressando o panorama brasileiro do TS. Desta forma, entre 2007 e 2010 foi realizado estudo prospectivo de pacientes atendidos no ambulatório de FC do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) com e sem FC submetidos à biópsia retal. Em 2013 foi aplicado em 14 serviços (9 públicos, 5 privados) que realizam o TS, um questionário

qualitativo através de visita às sete cidades que contam com Centros de Referência para atendimento de pacientes com FC em SP.

Nossos resultados demonstraram que a determinação de Cl^- em biópsias retais mediadas pela CFTR é um biomarcador robusto, sensível, preditivo e reproduzível para o diagnóstico e prognóstico da FC e com potencial uso para ensaios pré-clínicos de terapias moduladoras da CFTR.

A pinça jumbo e a solução salina fisiológica determinaram as melhores amostras para os estudos bioquímicos e de eletrofisiologia, a grande maioria dos indivíduos entrevistados não relataram maiores desconforto (76%), sendo a técnica utilizada segura e reproduzível.

O estudo do TS em SP demonstrou a necessidade urgente de equipamentos adequados de estimulação e dosagem do Cl^- no suor, associado à normatização da técnica e treinamento de pessoal capacitado para a sua realização.

Dando seguimento a este trabalho, estamos implementando novas ferramentas diagnósticas para a FC: a avaliação eletrofisiológica da CFTR em câmara de *Ussing* através da cultura de células nasais e/ou organoides e da unção da CFTR na glândula sudorípara pelo evaporímetro. Por fim, todos os métodos de avaliação diagnóstica devem respeitar procedimentos operacionais padrão (POP), sendo que alguns nomeadamente os de eletrofisiologia, ainda dispõem de aplicação limitada a poucos centros no mundo.

Palavras-Chave: Eletrofisiologia; Cloro; Biópsia; Suor; CFTR.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease, common among Caucasians. In Europe and USA, it has an incidence of 1:2,500-1:6,000 in newborns and 1: 25 for healthy carriers. In Brazil, the estimated incidence is 1:10,000 in newborns. It is caused by the presence of two mutated CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) genes encoding for CFTR protein, a Chloride (Cl⁻) channel expressed at the apical membrane of epithelial cells. CFTR is the main regulator of ion transport and water. Its defect leads to dehydrated epithelia and to the production of viscous mucus secretions that clogs the airways and ducts of exocrine glands, leading to the clinical manifestations of CF disease, mostly affecting the respiratory and digestive tracts (pancreas, liver and intestine). CFTR is also expressed in the sweat and salivary glands, and in the male reproductive system. The degree of CFTR function will determine the severity of the disease.

About 2000 mutations have been already described in the CFTR gene. The F508del is the most prevalent, present in 85% of patients worldwide and 65% in Brazil. Mutations can be classified into six groups, depending on the molecular and cellular defect, and also determining the severity of the CF phenotype: Classical and Non-Classical. The Classical phenotype is best-known and frequent, presenting severe symptoms; but the Non-Classical phenotype, representing ~15 % of all CF patients, shows atypical symptoms, with variable organ involvement, which make the diagnosis difficult and often late.

CF thus includes a "spectrum of diseases" and its early detection in newborn screening, even before the first symptoms, opens up new perspectives for prognosis. Since CF diagnosis requires proof of CFTR dysfunction, there is an emerging need for accurate methods capable of detecting CFTR function with high sensitivity and of directing CF therapy, in the quest for the most appropriate treatment.

The first part of this study sought to consolidate the measurements of CFTR channel function in rectal biopsies as a biomarker for CF diagnosis and prognosis. The second part focused on the rectal biopsies procedure and its technical aspects and also on how it is perceived in the patients' perspective. The third part, approached how the sweat test (ST) procedure is carried out in CF centers in the state of São Paulo (SP), so as to assess the Brazilian scenario for the ST. To this end, between 2007 and 2010, we conducted a prospective study of patients seen at CF outpatient clinic, of the Clinical Hospital (HC) – State University of Campinas (Unicamp)

who underwent rectal biopsy and we also included non-CF subjects as controls. In 2013, a qualitative questionnaire was applied to 14 services (9 public, 5 private) which perform the ST by visiting the 7 cities of SP which have reference CF care centers.

Data shown that determination of CFTR-mediated Cl^- secretion in rectal biopsies proved to be a robust, sensitive, and reproducible predictive biomarker for CF diagnosis and prognosis, besides being a safe technique with the potential for use in preclinical trials of CFTR modulating therapies.

The jumbo forceps and saline solution determined the best samples for electrophysiology and biochemical studies. Moreover, the great majority of the individuals tested by this procedure did not report major discomfort (76%).

The work assessing the achievement of ST in SP, demonstrated an urgent need for adequate equipment for the stimulation of sweat and also for the measurement of Cl^- in sweat, associated with standardization and training of specialized personnel for its implementation.

As a follow up of this work, we are already implementing new diagnostic tools for CF, namely: the study of CFTR function in the sweat gland by the evaporimeter and in cultured nasal cells by Ussing chamber. Finally, all diagnostic methods must comply with strict standardized operation procedures (SOP) and some, including electrophysiology, still have limited use in few centers worldwide.

Keywords: Electrophysiology; Chloride; Biopsy; Sweat; CFTR.

1. INTRODUÇÃO

I. Histórico

Nas sociedades primitivas da Europa Oriental, antes mesmo da idade média, vários relatos históricos (achados em escavações) indicavam naquelas populações que já havia associação de alguns sintomas característicos da fibrose cística (FC) a óbitos (cfmedicine; Andersen, 1938).

Várias referências folclóricas na era medieval previam a morte para crianças de “gosto salgado” quando beijadas. Acreditavam estar “enfeitiçadas” (cfmedicine).

Pieter Paul (1564-1617), professor de botânica e anatomia da Universidade de Leiden, Holanda, em 1595, faz a primeira descrição do comprometimento do pâncreas em uma criança de 11 anos que certamente morreu com FC: “Ela apresentava sintomas estranhos durante oito anos. A morte havia sido causada pelo pâncreas...” (cfmedicine).

Alonso y de los Ruyzes de Fonteca (1606), professor de medicina na Universidade de Henares (Espanha), faz o primeiro relato de suor salgado. Ele descreve, de forma pitoresca, que as crianças identificadas pelo gosto salgado, ao se esfregarem os dedos na testa, estariam enfeitiçadas e morreriam logo (Quinton & Bijman, 1983; Quinton, 2007). Registros anedóticos de meados de 1600 relatam condições que provavelmente refletiam a esteatorréia decorrente da insuficiência pancreática. Em 1888, Samuel Gee, Hospital St Bartholomew, descreveu uma síndrome que denominou “afeição celíaca” da seguinte forma: “... existe uma espécie de indigestão crônica que se encontrou em pessoas de todas as idades, mas é especialmente susceptível de afetar crianças entre um e cinco anos. Sinais da doença são gerados pelas fezes soltas, sem forma, mais volumosas que a quantidade de alimento ingerido parece dar conta; pálida, como se desprovida de bile; fermentada e espumante, provavelmente devido à fermentação; fedorenta, fedor frequentemente grande, consequência da comida ter sofrido putrefação, em vez de mistura”. Registros também do final do século 19 descrevem complicações de mecônio associadas a lesões pancreáticas. Landsteiner, que também definiu os grupos sanguíneos, publicou a primeira descrição do íleo meconial (IM) associado à enfermidade pancreática (Landsteiner, 1905; Quinton, 1999).



Dorothy Andersen
cf.medicine

A virada do século 20 trouxe as primeiras observações que começaram a associar doença pulmonar com diarreia e função pancreática anormal, bem como relatos de esteatorréia familiar congênita. Em 1938, a “fibrose cística do pâncreas” (**Figuras I e II**) foi descrita pela primeira vez de forma sistemática e detalhada por Dorothy H. Andersen, do Laboratório Patológico do *Babies Hospital* e do Departamento de Patologia da

Faculdade Real de Médicos e Cirurgiões da Universidade de Columbia, Nova York, em um artigo que leu em uma reunião conjunta da Sociedade Americana de Pediatria com a Sociedade para a Pesquisa Pediátrica (Andersen, 1938). Acredita-se que mais de 600 crianças com FC foram encaminhados para ela em Nova York, onde trabalhou com o médico Paul di Sant'Agnese. Andersen era fumante inveterada e morreu de câncer de pulmão com a idade de 62 anos.

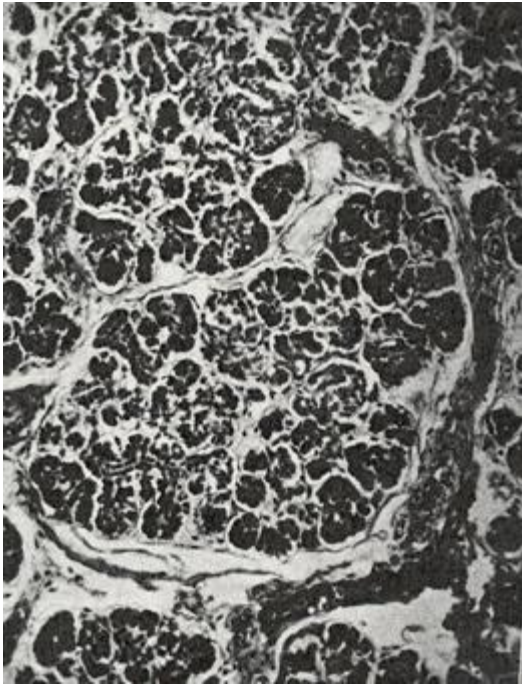


Figura I: Pâncreas de recém-nascidos não-FC com idade de 3 dias. (Andersen, 1938).

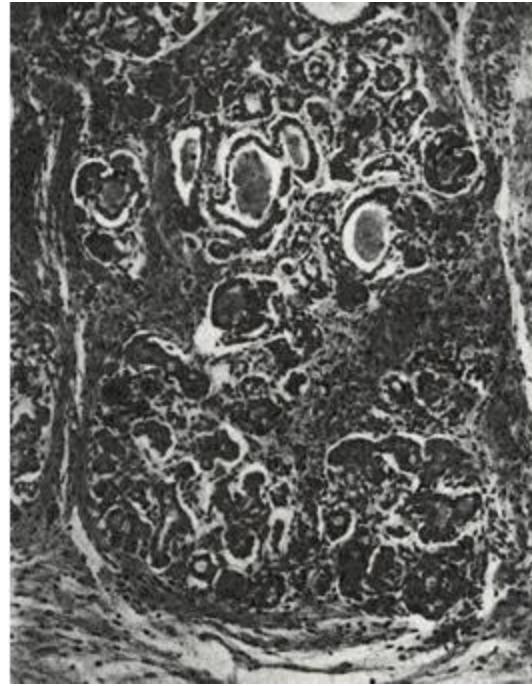


Figura II: Pâncreas de recém-nascidos FC, com idade de 6 dias. (Andersen, 1938).

Farber introduziu o termo mucoviscidose, do alemão *muskoviszidose*, que significa "muco espesso", para desafiar a nomenclatura inicial de Andersen. Ele acreditava que a causa da doença era um generalizado "estado de muco espesso" (Farber, 1943).

Os dois nomes adotados refletem de forma parcial o que ocorre com a doença (**Figura III**).

Em 1946, Andersen e Hodges apresentaram a primeira evidência de se tratar de doença genética, resultante de uma mutação autossômica recessiva mendeliana (Andersen & Hodges, 1946).

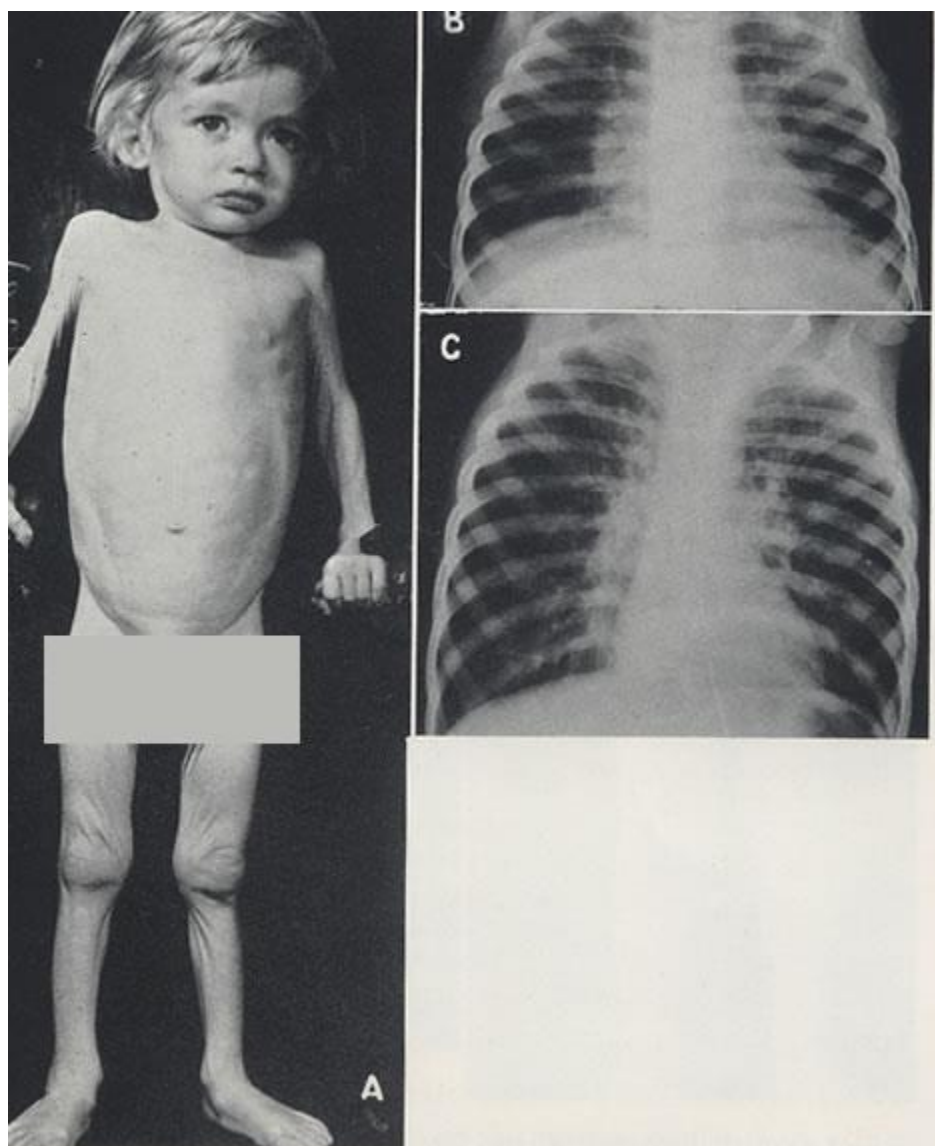


Figura III: (A) Paciente com fibrose cística do pâncreas aos dois anos e cinco meses de idade. (B) Pulmões com um ano e dois meses de idade. (C) Pulmões com dois anos e cinco meses de idade. (May & Lowe, 1949).



Di Sant'Agnese.
cf. medicine

Dois anos depois, num verão intenso de Nova York, houve uma alta incidência de desidratação em crianças com perda de sais. Di Sant'Agnese, Hospital de Columbia, procurou a origem da perda de sal que havia precipitado a prostração durante a onda de calor. Em 1953, ele apresentou suas conclusões à Sociedade Americana de Pediatria. Elas sustentavam os conhecimentos empíricos do folclore primitivo do século 20 sobre beijos de gosto salgados na literatura médica (Di Sant'Agnese et al. 1953). Demorou vários anos para que aceitassem essa alteração como um componente fundamental da doença. Contam os relatos,

que após a sua apresentação em um congresso médico, não foi feita nenhuma pergunta e que quando Di Sant'Agnese procurou um fisiologista, estudioso do suor, ele disse que: “tal perda de sal no suor seria impossível!”. Decorridos cinco anos deste relato, foi estabelecido que a singularidade desta função fisiológica anormal especial permitia um método para o diagnóstico preciso e acessível: o teste do suor (TS). Inicialmente o TS era realizado sem estimulação. Colocava-se o paciente envolto até o pescoço em um plástico (**Figura IV**), em local aquecido, durante 1-2 horas, sob estresse térmico, para promover a transpiração e a coleta do suor (Shwachman et al., 1961; Wallis, 1997). Após o relato de um óbito relacionado ao TS, houve o aumento da busca de novos métodos de estimulação para a sua substituição (Misch & Holden, 1958).

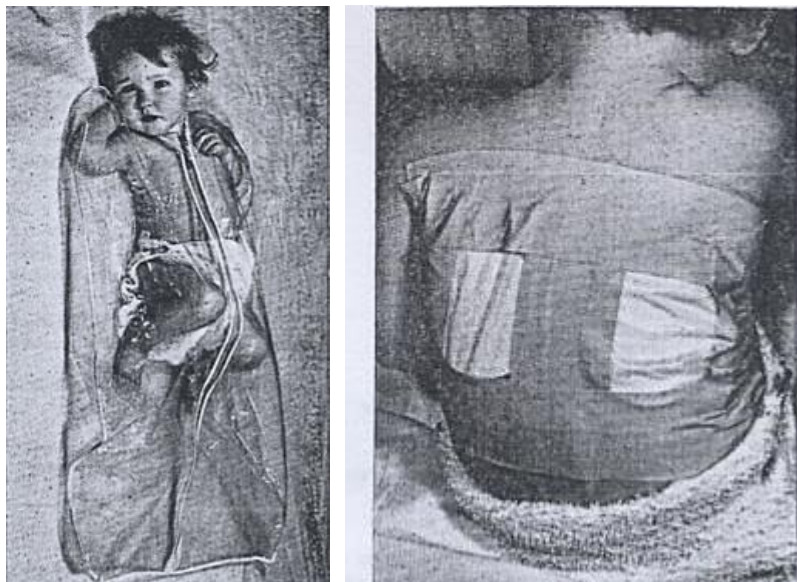


Figura IV: Realização do teste do suor em paciente envolto em plástico. (Copyright 1956 Massachusetts Medical Society.)

Métodos alternativos para a detecção de Cloreto (Cl^-) na pele, por meio de impressões digitais em placas impregnadas com nitrato de prata e de cromato de potássio, foram criados por Gahm e Schwachman (**Figuras V e VI**) (Gahm & Schwachman, 1956). Outros semelhantes, de reação ao contato com o suor salgado, foram relatados (Wallis, 1997), porém, nunca foram validados.



Figura V: Impressão palmar de uma criança sem FC. Figura VI: Impressão palmar de uma criança FC. (Gahm & Shwachman, 1956).

Foram todos substituídos pela técnica quantitativa da iontoforese de pilocarpina desenvolvida em 1959 por Gibson e Cooke (Gibson & Cooke, 1959). Este método até hoje ainda é tido como método padrão-ouro para diagnóstico da FC (Shah & Moatter, 2006). Nesta época, iniciaram os relatos de pacientes com manifestações mais brandas da doença, mostrando a diversidade clínica da FC. Di Sant'Agnese, em 1953, relatou pacientes com FC e suficiência pancreática (Di Sant'Agnese et al. 1953). Durante muitos anos, a FC foi confundida com a doença celíaca. Em 1950, Willem Dicke descreve em sua tese o papel do glúten, sendo a doença celíaca desde então reconhecida como uma entidade clínica distinta (Dicke et al. 1953). Um ano depois, Paulley descreve a atrofia vilositária como diagnóstico diferencial definitivo da doença celíaca (Paulley, 1954). Até então, mesmo com o TS, nem sempre era simples a distinção entre essas duas doenças.

Parkins realizou biópsias retais de sucção para o diagnóstico de FC; descreveu alterações histológicas típicas de FC que, quando presentes, elucidariam o diagnóstico da doença. Não ficou claro no estudo a proporção de casos diagnosticados (**Figura VII**). Este método de diagnóstico complementar, apesar de ter sido repetido por outros, nunca ficou popular (Parkins et al. 1963).



Figura VII: a) À esquerda biópsia retal de paciente FC; b) à direita biópsia retal de indivíduo não-FC. (Parkins et al., 1963).

A biópsia retal volta ser realizada posteriormente para avaliação das anormalidades de transporte de íons na mucosa colônica (Veeze et al., 1991; Mall et al., 1998), sendo atualmente utilizada em ensaios de avaliação *ex vivo* da função da CFTR na mucosa retal (Clancy et al., 2013; Derichs et al. 2010; Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012).

Do final da década de 50 até o início dos anos 80, o TS foi o único método para o diagnóstico da FC associado às manifestações clínicas da doença. Mas, cada vez mais pacientes eram diagnosticados e nesse período as associações de pais e comitês médicos começaram a se organizar para o cuidado dos pacientes com FC. A primeira associação surge nos EUA a partir do encontro de pequenos grupos de pais na Filadélfia, sendo criada em 1952 a fundação americana, fundada oficialmente em 1955, e que hoje representa uma das maiores associações de cuidado e pesquisa para FC no mundo, a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF). Em 1960 surge a associação canadense e em 1964 a do Reino Unido, a *Cystic Fibrosis Research Foundation Trust* (cfmedicine).

Estas associações têm sido fundamentais para melhorar a qualidade de vida das pessoas com FC e de suas famílias; todas com apoio geral e de conselhos. Promovem o financiamento de serviços clínicos e de investigação.

Os comitês médicos e de pesquisa se organizaram e em 1965 surgiu a primeira associação mundial para o cuidado de pacientes com FC em Paris, sob a presidência de Di Sant'Agnese, com o objetivo de reunir médicos e pesquisadores de todo o mundo para a troca de experiências; hoje denominada *Cystic Fibrosis World Wild* (CFWW). Em 1969 aconteceu a

primeira reunião do grupo de trabalho europeu para a FC (*European Working Group on Cystic Fibrosis* - EWGCF), que hoje promove os encontros europeus anuais (cfmedicine).

Nos últimos 30 anos, nenhuma outra doença mobilizou os familiares de forma tão organizada a ponto de constituírem associações de pais na Europa, nas Américas e inclusive no Brasil, desempenhando um importante papel na evolução da FC (Ribeiro, Ribeiro & Ribeiro, 2002).



Jeanette Crossley
cfmedicine

Jeanette Crossley, em 1979, faz o primeiro relato sobre método de triagem neonatal para a FC (Crossley, Elliott & Smith, 1979). Foi ela quem primeiro descreveu o tripsinogênio imunorreativo elevado no sangue de pacientes com FC, que decorre da insuficiência pancreática exócrina, pela obstrução dos ductos pancreáticos. Surge então uma nova perspectiva para os pacientes com FC, mesmo antes da primeira manifestação clínica da

doença: **o diagnóstico precoce.**

Decorridos 30 anos da descoberta do teor de sal anormal no suor de pessoas com FC e da utilização do TS como método de diagnóstico, em 1983, Paul Quinton (professor de Pediatria e de Ciências Biomédicas da Universidade da Califórnia), descreve o defeito básico das glândulas



Paul Quinton na NACFC em 2012
(arquivo da autora).

sudoríparas (Quinton & Bijman, 1983; Quinton, 1983).

Usando uma série de experimentos de microperfusão nas glândulas sudoríparas em seu próprio antebraço, demonstrou que as glândulas sudoríparas dos pacientes com FC são impermeáveis ao Cl^- . Demonstrou também que o defeito básico está localizado na membrana apical das células epiteliais dos portadores de FC.

Estes avanços são os mais importantes para a compreensão do defeito básico da FC; explicam a

fisiopatologia do suor salgado; abrem portas para os ensaios de terapias reparadoras. Na mesma época foi identificado o aumento na reabsorção de sódio (Na^+) como uma característica regular da FC nas vias aeríferas (Knowles et al., 1983; Boucher et al., 1986).

Em 1984, Sato e Sato descreveram a alteração na resposta β -adrenérgica das glândulas sudoríparas na FC *in vivo* e *in vitro* (Davis et al., 1980; Sato & Sato, 1984). Serviu de base para o estudo atual da função da CFTR como canal de Cl^- (CFTR- Cl^-) nas glândulas sudoríparas. Hoje, com um aparelho denominado evaporímetro, pode-se estudar a função da CFTR- Cl^- e, através de sua correlação com fenótipo/genótipo acurar o diagnóstico da FC. Este método tem sido descrito como uma ferramenta útil por identificar respostas β -adrenérgicas típicas que podem discriminar os indivíduos saudáveis, dos com FC, dos portadores de uma mutação e das doenças relacionadas à CFTR (Quinton et al., 2012).

Nas vias aeríferas de pacientes com FC o transporte de Cl^- está diminuído e o de Na^+ aumentado (Boucher et al. 1986; Frizzell et al. 1986; Knowles et al., 1981) bem como na mucosa retal, como demonstrado nos estudos de diferença de potencial retal realizado em pacientes com e sem FC (Goldstein et al., 1988).

Em 1985 é localizado o defeito no cromossomo 7 (Knowlton et al., 1985; Wainwright et al., 1985) e finalmente, em 1989, pelos esforços conjuntos de três laboratórios, o gene foi clonado e a proteína codificada, ambos denominados de CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Posteriormente foi demonstrado, que a CFTR funciona como um canal de Cl^- (Bear et al., 1992; Welsh & Smith, 1993), o que é fundamental para os ensaios atuais.

Nos primeiros anos após a identificação do gene havia grande expectativa de que a terapia genética iria mudar o padrão de atendimento clínico dentro de um curto espaço de tempo (Drumm et al., 1990). Compreensivelmente, a identificação do gene *CFTR* como causador da FC em 1989, criou esperança para o tratamento curativo visando o defeito básico além do sintomático (Clancy & Jain, 2012). A abordagem mais óbvia, a terapia genética (viral ou não viral), poderia ser um benefício para todos os pacientes com FC, independente de seu genótipo. Até o momento, no entanto, a modulação do gene *CFTR* ou a substituição dele, apesar dos avanços promissores, não se traduziu em benefícios clínicos. Embora tenham sido realizados mais de 20 ensaios clínicos, a baixa expressão do transgene *CFTR* quando administrado por lipossomas, as respostas inflamatórias às proteínas virais, o desenvolvimento de resposta imune humoral, impedindo readministração bem sucedida, e os riscos de mutagênese insercional, no caso de integração de vetores virais, são os principais obstáculos da terapia gênica para FC (Ikpa, Bijvelds & de Jonge, 2014).

Durante os anos 90, houve uma série de benefícios práticos consequentes à identificação do gene *CFTR* para as pessoas com FC e suas famílias. O diagnóstico pré-natal preciso, o diagnóstico genético pré-implantação do feto e da incorporação de testes de DNA em muitos programas de triagem neonatal, a identificação de portadores do gene mutante, foram todos grandes avanços que se seguiram a identificação do gene da FC.

Desde 1989 cerca de 2000 mutações diferentes do gene *CFTR* foram descritas (genet.sickkids) e embora a terapia gênica tão sonhada não tenha sido alcançada, o desenvolvimento de medicamentos para tratar mutações específicas está mais próximo, como o VX770 para tratamento da mutação G551D (Ramsey et al., 2011). São as drogas moduladoras da proteína CFTR, foco atual da terapia para a FC. A mutação F508del é a mais frequente em todo o mundo, inclusive no Brasil, e os estudos sobre as diversas mutações no gene *CFTR*, sua relação com genes modificadores e ambientes, a função “do canal CFTR” e sua interação com outros canais presentes na célula associada à fenótipos clínicos da FC são emergentes trazendo um novo conceito de “canalopatias” (Bonadia et al., 2014; Marson et al., 2012; Schmunk & Gargus, 2003; Sosnay & Cutting, 2014).

Em 2004 foi publicado trabalho em humanos que correlacionou a função da CFTR–Cl⁻ com genótipo e fenótipo da FC através de biópsias retais (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 2004).

Hoje, com os conhecimentos da eletrofisiologia que possibilitam quantificar a função da CFTR na mucosa nasal por meio da medição do potencial nasal (Ooi et al., 2014), nas biópsias retais com o estudo bioelétrico em câmaras de *Ussing* (Clancy, 2010; Clancy et al., 2013; Derichs et al., 2010; Hug et al., 2011; Servidoni et al., 2013; Sousa et al., 2012) e na glândula sudorípara com o evaporímetro (Quinton et al., 2012; Gonska et al., 2009), é possível também testar drogas moduladoras da CFTR *ex vivo* (Roth et al., 2011) sem expor os pacientes aos efeitos colaterais das mesmas, facilitando o teste preclínico de vários compostos.

Estudos recentes mostraram que o processo de diferenciação das células tronco crípticas é reversível e que as células epiteliais altamente diferenciadas, como as presentes na traqueia ou biópsias brônquicas, podem ser reprogramadas para chegar a um estado indefinido proliferativo de células tronco adultas (Xiao, Li & Liu, 2012). Resultados preliminares mostraram que estas células podem ser analisadas em câmara de *Ussing* à semelhança das biópsias retais (Amaral MD Lab, resultados ainda não publicados).

Baseados nos conhecimentos de eletrofisiologia e da genética, implantamos em nosso laboratório novos métodos de diagnóstico, utilizando a avaliação da função da CFTR em estudos

de biópsias retais (dois trabalhos aqui incluídos - Servidoni et al., 2013; Sousa et al., 2012) e na glândula sudorípara com o evaporímetro (estudo realizado em Fevereiro de 2014, quando foram avaliados 42 sujeitos submetidos à TS, biópsia retal e evaporímetro, em estado de apreciação para publicação). Caminhando em paralelo à inovação, não pudemos deixar de avaliar o TS, ainda hoje método ouro para diagnóstico da FC. O TS foi avaliado quanto aos procedimentos para a sua realização no estado de SP (terceiro trabalho desta tese).

O centro de referência especializado em FC da Unicamp conta com a colaboração valiosa de centros de excelência em pesquisa desde 2007 com os grupos de Portugal, representado pelas Prof. Margarida Amaral e Prof. Marisa Sousa, e da Alemanha, com o Prof. Karl Kunzelmann. A partir de 2014 passou a ter a parceria com o grupo do Canadá, com a colaboração da Prof. Tanja Gonska. Estes estudos são frutos decorrentes dessas parcerias.

Breve Histórico da FC no Brasil e em São Paulo:

Em nosso país, as médicas Tatiana Rozov, no Instituto de Criança em São Paulo, e Ludma Trotta Dallalana, no Hospital Fernandes Figueira no Rio de Janeiro, iniciaram o atendimento de pacientes com FC no início da década de 70; seguidas em 1973 por Francisco Caldeira Reis, em Minas Gerais, com especialização no Canadá, e Fernando Antonio de Abreu e Silva, em Porto Alegre, com especialização na Holanda. Três anos depois, em 1976 houve um encontro na Santa Casa de São Paulo com o médico e pesquisador Prof. Shwachman, responsável pela criação de scores clínicos ainda hoje utilizados. Ele trouxe novos desafios à classe pediátrica brasileira no diagnóstico e tratamento da FC. Já em 1976, a gastroenterologista de adultos, Dra. Adriana Sevá, professora da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), fazia o TS para diagnóstico de FC em adultos e crianças no laboratório de gastroenterologia da faculdade. Em 1977, o médico Antônio Fernando Ribeiro chega do seu estágio de gastroenterologia pediátrica da Argentina com o Prof. Tocalino, onde acompanhou pacientes com FC e trouxe para Campinas sua experiência, passando a diagnosticar e tratar pacientes com FC. Publicou o primeiro artigo sobre FC da Unicamp em 1978 (**Figura VIII**). Em Campinas, foi criado o primeiro centro para atendimento de FC no interior de SP. Inicialmente os pacientes eram atendidos no ambulatório geral de gastropediatria, sendo em 1987 criado o ambulatório de FC e há três anos o de triagem neonatal de FC. A dispensação de medicamentos não existia. Contava-se com a boa vontade e o trabalho voluntário de uma mãe assistente social

que trabalhava na Varig (empresa de aviação nacional) e que trazia as enzimas pancreáticas, mesmo com toda a burocracia junto ao banco central para a compra da moeda estrangeira necessária para a importação da medicação. Em 1981, a pneumologista Dra. Agnes Guglielmi passou a integrar o grupo, contribuindo para a organização do atendimento dos pacientes com FC. Surge nessa época o serviço da Santa Casa de São Paulo e o da Universidade Federal de São Paulo.

Em 1983, foi elaborado o primeiro manual de conduta de diagnóstico e tratamento de FC, que foi publicado nos Anais Nestlé e distribuídos de forma gratuita (**Figura VIII**). Na década de 80, antes mesmo da Associação Paulista, foi criada em Campinas a Sociedade de Apoio aos Pacientes FC (SAFC) e que depois passou a se chamar Fibrocis, como é conhecida hoje. A Fibrocis é uma entidade sem fins lucrativos, que apoia o trabalho médico, auxiliando-os no monitoramento dos pacientes e na orientação e apoio às famílias. Na década de 90, o Dr. José Dirceu Ribeiro e a fisioterapeuta Maria Ângela Ribeiro passaram a integrar a equipe, seguidos de vários profissionais na área de gastroenterologia, infectologia, nutrologia, hepatologia e endocrinologia, tornando a equipe multiprofissional, que hoje promove um atendimento especializado nas diferentes áreas em uma única consulta a cada visita do paciente ao serviço. Hoje, o estado de SP conta com sete centros especializados para atendimento dos pacientes com FC nas cidades de Campinas, Ribeirão Preto, São José do Rio Preto, Botucatu e três na cidade de São Paulo capital.

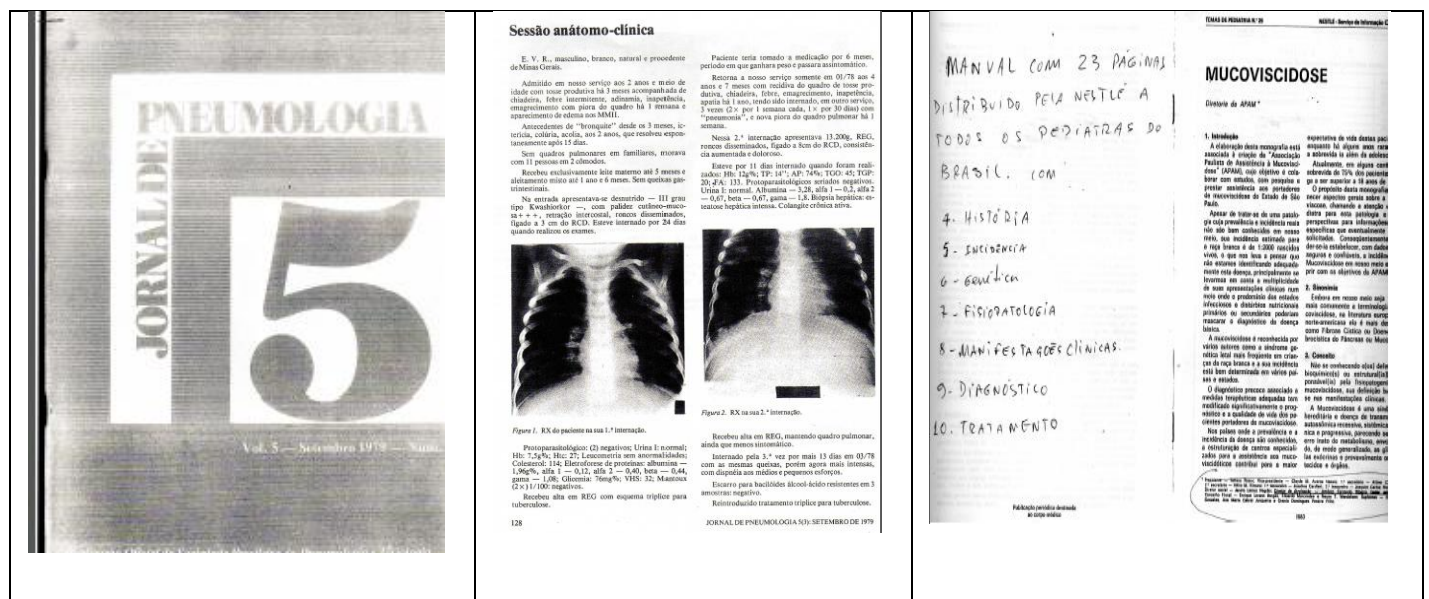


Figura VIII: A Primeira publicação de FC da Unicamp (1978) e primeiro manual de FC no Brasil (1983). Arquivo UNICAMP.

II. Métodos de Diagnóstico da Fibrose Cística

Tradicionalmente o diagnóstico clínico da doença é definido pela presença de (Moskowitz et al., 2008):

→ Uma ou mais características fenotípicas da FC

- a) doença sinopulmonar crônica;
- b) anormalidades gastrointestinais / nutricionais: íleo meconial (IM), síndrome da obstrução intestinal distal (DIOS), insuficiência pancreática exócrina com esteatorréia;
- c) síndrome de perda de sal;
- d) azoospermia obstrutiva (CBAVD – do inglês *congenital bilateral absence of de vas deferens*)

associada a

→ Evidência de uma anormalidade na função da CFTR com base em um dos seguintes procedimentos:

- a) Presença de duas mutações causadoras de doença no gene *CFTR*;
- b) Dois valores anormais de Cl^- no suor em duas dosagens em momentos diferentes;
- c) Alterações na diferença de potencial nasal (DPN) com medidas características de FC e, mais recentemente, alteração do transporte de Cl^- na biópsia retal avaliada em câmara de *Ussing* (Dequeker et al. 2009).

O diagnóstico da FC pode ainda ser feito na ausência de características fenotípicas da FC:

- a) pela triagem neonatal alterada (IRT) associada a presença de mutações no gene *CFTR* e/ ou dosagens de Cl^- no suor alteradas;

ou

- b) pelo diagnóstico pré-natal (detecção de duas mutações *CFTR* causadoras de doenças), no caso de familiares com FC.

Resumindo: classicamente o diagnóstico de FC é confirmado pelo TS em duas dosagens ($\text{Cl}^- \geq 60 \text{ mEq/L}$) e/ou pela detecção de duas mutações para FC, associado ao quadro clínico compatível com a doença (Farrell, 2008).

1. Fenótipo

O fenótipo da FC é determinado pela presença de mutações no gene *CFTR*, associadas à ação de genes modificadores e aos fatores ambientais. Tem quadro clínico polimorfo e multissistêmico e pode ser dividido em: fenótipo clássico e não clássico.

1.1. Clássico:

Presença de suor salgado devido a alteração das concentrações de sais no suor que pode levar a distúrbios metabólicos graves principalmente em crianças pequenas, durante estações com temperaturas elevadas, secundárias a perda de sal,

Manifestações digestórias com insuficiência pancreática (IP) exócrina, sendo este o sintoma em geral mais precoce e prevalente, presente em cerca de 75% dos fibrocísticos ao nascimento, em 80-85% até o final do primeiro ano, e em 90% na idade adulta (Ribeiro et al. 2002), tendo como manifestação a esteatorréia e a desnutrição devido à má digestão e absorção de gorduras e proteínas. A IP também pode levar no período neonatal, em cerca de 5% dos FC, ao edema hipoproteinêmico secundário; o IM (obstrução do íleo terminal por um mecônio espesso) está presente em aproximadamente 15% dos recém-nascidos (RN). A maioria dos diagnósticos de IM (90%) é relativa à FC (Colin et al. 1994; Littlewood et al. 2006; Ribeiro et al. 2002; Blackman et al. 2006) ou seu equivalente nos mais velhos com a DIOS cuja incidência é variável; a doença hepática crônica está presente em mais de 50% das necrópsias. Em estudos prospectivos, 25% dos pacientes apresentam alterações laboratoriais, cerca de 5% são sintomáticos e podem evoluir para cirrose biliar associada à hipertensão porta, sendo esta a segunda causa de óbito na FC (Ribeiro et al. 2002; Blackman et al. 2006).

O acometimento do aparelho respiratório de intensidade variável é progressivo devido à doença pulmonar obstrutiva supurativa crônica. As alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas e evoluem principalmente devido à colonização bacteriana crônica, secundária à retenção de secreção, que favorece a metaplasia do epitélio brônquico, impactação mucóide periférica e desorganização da estrutura ciliar. Culmina com o *cor pulmonale*. É o acometimento respiratório que determina o prognóstico do paciente, sendo a primeira causa de morte na FC.

A azoospermia com consequente infertilidade, presente em mais de 95% dos homens com FC, é secundária às alterações dos dutos deferentes, que podem estar ausentes, atróficos ou fibrosados como consequência de sua obstrução congênita. Mulheres com FC são férteis, apesar de um número reduzido poder ter um muco cervical anormal, contribuindo para a diminuição da fertilidade neste grupo específico (Moskowitz et al. 2008).

1.2. Não clássico:

Os sintomas aparecem mais tardiamente, muitas vezes na adolescência ou depois, com doença mais leve e suficiência pancreática (15% dos pacientes com FC) e que predispõe a pancreatites recorrentes tidas como “idiopáticas” (Bombieri et al. 2011), sintomas respiratórios e otorrinolaringológicos insidiosos e crônicos; obstrução dos dutos deferentes com azoospermia. O TS pode ser *borderline*, normal ou com valores anormais, porém mais baixos que nos pacientes com o fenótipo clássico (Knowles & Durie, 2002).

A doença relacionada a FC, do inglês CFTR-RD (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Disorders*), pode ser definida como “uma entidade clínica associada com disfunção CFTR, que não preenche os critérios diagnósticos de FC” (Bombieri et al. 2011). Inclui pacientes com doenças ligadas a mutações no gene *CFTR*, ou a outros genes (Knowles & Durie, 2002). Esses pacientes têm clínica que muitas vezes se sobrepõe à da FC, sendo descrito e aceito para esse critério, a ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD), a pancreatite crônica ou recorrente aguda e bronquiectasias disseminadas. Podem apresentar algum grau de disfunção da CFTR identificada nos testes de eletrofisiologia com potencial nasal, biópsia retal e/ou com o evaporímetro, porém sem preencher os critérios de diagnóstico descritos para a FC (Bombieri et al., 2011; Quinton et al., 2012).

2. Triagem neonatal

A triagem neonatal (TNN) é realizada a partir da dosagem do tripsinogênio imunoreativo (IRT) no papel de filtro do teste do pezinho, descrito em 1979 por Jeanette Crossley na Nova Zelândia (Crossley et al. 1979). Na FC, a liberação do tripsinogênio para a circulação sanguínea parece estar prejudicada pelas secreções anormais dos ductos pancreáticos que, devido às secreções espessas, estão obstruídos. Assim, os níveis de IRT se elevam na FC, o que constitui um importante marcador na triagem da FC. Pode ser realizada de diferentes maneiras: IRT/ IRT, IRT/ DNA, IRT/ IRT e DNA, de acordo com diretriz de cada país (Audrezet et al., 1993).

Os objetivos da prevenção com a TNN são: prevenir a desnutrição precoce e deficiência de vitaminas, reduzir complicações pulmonares iniciais (atelectasia, pneumonia, infecções de vias aéreas) e melhorar o quadro respiratório a longo prazo, diagnosticando e tratando precocemente as colonizações com bactérias responsáveis pela lesão supurativa pulmonar. Melhorar resultados em longo prazo incluindo o crescimento, a função cognitiva e a sobrevida.

Prevenir uma prolongada "odisséia diagnóstica". Promover aconselhamento genético às famílias (Grosse et al., 2004; Sontag et al., 2005; Sontag et al., 2006)

No Brasil, a dosagem de IRT da TNN é realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Delfia® (Wallac-EG &G Co.), com metodologia imunofluorimétrica.

O teste Delfia® de IRT neonatal é um ensaio de dois sítios imunofluorimétricos de fase sólida. A reação se baseia na técnica de sanduíche direto, na qual dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra dois determinantes antigênicos separados na molécula de IRT. As amostras de sangue contendo IRT reagem simultaneamente com anticorpos monoclonais imobilizados em fase sólida (dirigidos contra um sítio antigênico específico na molécula de IRT) e anticorpos monoclonais marcados com európio contidos na solução tampão de teste (dirigidos contra outro sítio específico diferente). A dosagem do IRT é um indicador indireto da doença, uma vez que avalia a integridade da função pancreática. Tem sensibilidade de 95% e especificidade entre 34 a 75% com 15% de falsos negativos. A primeira amostra da IRT (IRT1) deve ser coletada entre o 2º e o 7º dia de vida. Valores de IRT ≥ 70 ng/dl são considerados alterados e deverá ser realizada uma nova coleta (IRT2), após 16º dia e antes do 30º dia de vida, idealmente (Cabello et al., 2003). O IRT é um exame que se apresenta elevado em várias circunstâncias, que não propriamente a FC, tais como na prematuridade e na presença de infecções, com alta taxa de resultados falso-positivos, principalmente no IRT1, por isso se repete a coleta. O tempo decorrente entre as coletas das duas amostras é de extrema importância, visto que há uma queda crescente dos níveis da enzima com o passar dos dias e, após 45 dias de vida, o valor do IRT se normaliza mesmo na criança afetada, dificultando o diagnóstico da FC.



O protocolo do Programa de TTN do estado de SP para a FC preconiza:

Resultado negativo - Todos os serviços de referência da TNN são responsáveis pela emissão dos resultados normais. Em 2013 a APAE-SP (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais) iniciou a implantação do sistema de resgate desses resultados de exames por via eletrônica. Na hora da alta hospitalar, a família recebe uma senha e um *login* e pode resgatar de forma automática o resultado final do exame, de TNN *on line* (quando o teste é negativo).

Resultados falso-negativos - O IM pode estar relacionado a testes falso-negativos, pois com a desobstrução intestinal ocorre rápida queda dos níveis de IRT no sangue. A queda progressiva do IRT, depois de 30 dias de vida ocorre independentemente da FC.

Resultado positivo - Todos os serviços de referência da TNN trabalham com “busca ativa” para a captação, confirmação do diagnóstico e acesso aos centros especializados para cada uma das doenças detectadas pela TNN, com a garantia da confirmação do diagnóstico e tratamento dos bebês selecionados como positivos.

Segue abaixo fluxograma realizado pela Secretaria do Estado de SP.

Com a TNN-FC positiva (2 IRT $\geq$ 70 ng/dl) o RN é encaminhado para o serviço de referência para atendimento especializado e realização do TS . Exame que se segue a TNN positiva.

TESTE DO SUOR (Gibson & Cooke) - Valores de Cl^- no suor:

- Dois TS com dosagens de Cl^- menores de 30 mEq/l, normais, nos menores de 6 meses, descartam a doença. Essa criança deve permanecer em seguimento de puericultura com seu pediatra;
- Dois TS com dosagens de Cl^- entre 30 e 60 mEq/l, são duvidosos ou limítrofes, essas crianças não devem repetir o exame, mas devem permanecer em acompanhamento conjunto do pediatra com médico especialista nessa doença;
- Dois TS com dosagens de Cl^- acima de 60 mEq/l, diagnóstico deve ser confirmado, os pacientes devem receber acompanhamento multiprofissional por especialistas no Centro de Referência para FC.

3. Teste do Suor

A dosagem quantitativa de eletrólitos no suor, Na^+ e Cl^- é conhecida como TS. O TS constitui ainda nos dias de hoje, teste de diagnóstico incontestável da FC, denominado de padrão-ouro (**Tabela I**). Ainda é realizado da mesma forma de quando foi descrito por Gibson & Cooke em 1959, e é baseado na técnica de iontoforese por pilocarpina.

Define-se a iontoforese como uma técnica não invasiva que usa potencial ($< 5\text{V}$) ou corrente elétrica ($0,1$ a 1 mA/cm^2) para prover uma maneira controlada de aumentar a transferência transdermal de uma variedade de drogas (Beauchamp & Lands, 2005; Crudy et al., 2001; Neusser et al., 1993; Rosell et al., 1988).

Uma vantagem do uso da iontoforese é a perspectiva do aumento de liberação de drogas ionizáveis quando comparada à absorção percutânea passiva. Na iontoforese, além da difusão passiva, a penetração da droga é aumentada pelos mecanismos de eletrorepulsão, eletrosmose e aumento da permeabilidade da pele (Beauchamp & Lands, 2005).

Atualmente, os equipamentos indutores de suor que utilizam a iontoforese de pilocarpina aplicam uma corrente contínua e constante, entre 0,1 e 5,0 mA/cm² com o auxílio de eletrodos (**Figura IX**).

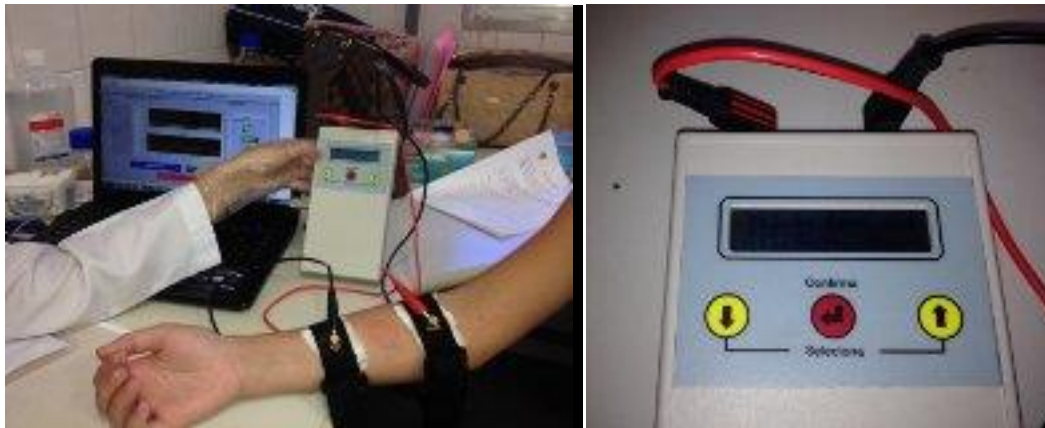


Figura IX: Estimulação para a coleta de suor. Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

Este método é dependente do profissional que o realiza. O profissional deve ter um bom conhecimento sobre a técnica a ser aplicada, pois pode promover desconforto com a presença de prurido, ardência, formigamento, queimaduras, eritema, vesículas, choque elétrico e pequenas lesões de pele, principalmente se tiver o contato da pele com o metal do eletrodo (erro de técnica). No Brasil, os equipamentos de estimulação são de fabricação caseira ou nas universidades, sem certificação pelos órgãos reguladores (Ex: Iontokit–Belo Horizonte-MG, Iontoplus- Presidente Prudente-SP e Iontoforese-RB51-Qualiterm- SP-SP). Ver detalhes da técnica no **Apêndice F – Suplemento 4: Métodos Suplementares - Teste do Suor**.

Na glândula sudorípara normal a estimulação adrenérgica induz um fluxo isosmolar de suor com a ativação da CFTR e da ENaC (canal de Na⁺) responsáveis pela reabsorção de Cl⁻ e Na⁺ respectivamente, além de água. Resulta no fluxo de um pequeno volume de suor contendo, em média, 16 mmol / L de Cl⁻ e 23 mmol / L de Na⁺ (Di Sant’Agnese et al., 1953; di Sant’Agnese & Powell, 1962). Em pacientes com FC, não há a reabsorção de Cl⁻ e Na⁺ e o suor tem concentrações aumentadas destes íons. As concentrações de Cl⁻ acima de 60 mmol/L são

consideradas anormais (Farrell & Kosciak, 1996) e valores entre 40 mmol/L e 60 mmol/L são *borderline* (Taylor, Hardcastle & Southern, 2009). Para as crianças menores de seis meses os valores considerados negativos são < 30 mmol/L, duvidosos entre 30 mmol/L e 60 mmol/L. Existe uma tendência para que essa idade limite de seis meses passe a ser de dois anos de idade.

O TS pode ter falso positivo em algumas das situações descritas a seguir :doenças endócrinas ou metabólicas, que dificilmente se confundem com a FC em seus aspectos clínicos; insuficiência supra renal não tratada; displasia ectodérmica; hipoparatiroidismo; diabetes insípido nefrogênico; deficiência de glicose 6-fosfatase; síndrome nefrótica; doença de von Gierke; fucosidose; colestase familiar; pseudo hipoaldosteronismo; hipotireoidismo e mucopolissacaridose.

A dosagem do Na^+ é um controle de qualidade do teste. A diferença entre a dosagem de Na^+ e Cl^- não deve ultrapassar 20 mEq/ L e a relação cloro/sódio deve ser sempre maior que um. Uma concentração de cloro maior que 160 mEq/L é fisiologicamente impossível sugerindo erro na coleta ou na dosagem.

Tabela I: Indicações para teste do suor (Diretriz NCCLS-2000)

Indicações Pulmonares e do Trato Respiratório Superior	Indicações Gastrointestinais	Indicações Metabólicas e outras indicações
• Tosse crônica • Pneumonia recorrente ou crônica • Sibilância * • Hiperinsuflação* • Taquipnéia* • Retrações * • Atelectasia (especialmente no lóbulo superior direito) • Bronquiectasia • Hemoptise • Infecção por <i>Pseudomonas</i> mucóide • Pólipos Nasais • Pansinusite • Baqueteamento digital	• Íleo meconial • Síndrome do plug meconial • Icterícia neonatal prolongada • Esteatorréia • Prolapso retal • Apêndice do muco impactado • Obstrução intestinal tardia • Intussuscepção recorrente • Cirrose • Hipertensão portal • Pancreatite recorrente	• Histórico familiar positiva • Falha de crescimento • Sabor salgado na pele • Cristais salgados na pele • Síndrome de esgotamento de sal • Alcalose metabólica • Hipoprotrombinemia • Deficiência de vitamina A (abaulamento da fontanela é um sinal chave) • Azoospermia • Ausência de vasos deferentes • Calcificação escrotal • Hipoproteinemia • Edema

*Se for persistente ou refratário ao tratamento

Com os conhecimentos atuais sobre a fisiopatologia e genética sabe-se que a FC é um “espectro de doença” cujo fenótipo reflete o grau de atividade da CFTR. O TS pode não espelhar esta atividade em alguns casos e mesmo o estudo molecular isolado, muitas vezes não é suficiente para o diagnóstico da FC, sendo necessários outros métodos auxiliares para a sua confirmação (Moskowitz et al., 2008; Quinton et al., 2012).

4. Diferença de Potencial Nasal (DPN)

O fluxo líquido de íons não pode ser medido *in vivo*, mas a interpretação das alterações bioelétricas pode ser inferida a partir de princípios desenvolvidos em estudos de tecidos humanos *ex vivo* e *in vitro*, de princípios básicos de transporte de íons e da fisiologia do epitélio. Este conceito é utilizado em todos os métodos que fazem medições bioelétricas para o estudo da função da CFTR e que serão aqui descritos (DPN, avaliação bioelétrica em câmara de *Ussing* em biópsias retais e cultura de células ou organóides intestinais, e evaporímetro).

A premissa do teste da DPN se baseia no fato de que as anormalidades bioelétricas na mucosa da cavidade nasal dos indivíduos com FC refletem as anormalidades encontradas no trato respiratório. Através da DPN podemos medir *in vivo* a diferença de potencial existente entre o lado interno e externo da célula epitelial da mucosa nasal, o qual é comparável à diferença de potencial da mucosa brônquica. Nos indivíduos saudáveis, o potencial basal é mantido pelo balanceamento da absorção de Na^+ e o transporte de Cl^- , resultando num controle rigoroso da quantidade de líquido na superfície da via aérea e do conteúdo iônico, ambos importantes na manutenção do *clearance* (Schüler et al., 2004; Procianoy, 2011). O valor encontrado relaciona-se ao transporte de íons através da membrana celular, em especial os íons Na^+ e Cl^- , sendo o lado mucoso mais negativo em relação ao interior celular. Valores basais normais situam-se em torno de -20 mV. Na FC o transporte do Cl^- é afetado pelo defeito na CFTR e a hiperabsorção do Na^+ pelos canais ENaC que geram uma DPN mais negativa, cerca de duas vezes os valores normais. Esta característica tornou possível diferenciar os portadores de FC dos normais, dos heterozigotos para mutações da FC e dos portadores de outras doenças respiratórias, de forma que a medida da DPN passou a ser utilizada como um teste complementar no diagnóstico de FC e, mais recentemente, para avaliação da eficácia de novos tratamentos (Knowles et al., 1995; Hofmann et al., 1997; Procianoy, 2011).

Os indivíduos com FC têm uma DPN muito maior, ou seja, mais negativa, do que os não FC. Eles também têm uma maior redução na magnitude da DPN após a perfusão com

amilorida. Isto sugere que o aumento da absorção de Na^+ é um defeito primário na via aérea das pessoas com FC. A anormalidade mais consistente no perfil dos pacientes com FC na DPN é a resposta baixa ou nula à perfusão com uma solução de 0mM de Cl^- . Em contraste com a grande resposta sustentada no epitélio não FC, existe uma pequena resposta inicial dos epitélios FC o qual, em seguida, retorna aos níveis anteriores.

Resumidamente, a DPN é baseada na diferença de potencial elétrico entre uma medida subcutânea com eletrodo de referência colocado para criar local de potencial zero e um de eletrodo de cloreto de prata ligado a um cateter nasal. A sonda é colocada sob o corneto inferior no ponto máximo de tensão negativa e mantido nesta posição durante todo o período de teste. As gravações são feitas durante o fluxo contínuo de solução salina, a uma taxa de 5 ml / min até se conseguir uma linha de base consistente, então um protocolo padrão é aplicado para investigar a função da CFTR (Schüler et al., 2004).

As técnicas para realização da DPN diferem entre os centros. Entretanto, a maioria dos centros que realiza esse teste mantém a reprodutibilidade do método (**Figura X**). Existem dois métodos: o clássico que utiliza o eletrodo de referência posicionado no tecido subcutâneo e o método modificado, que utiliza o eletrodo referência sobre uma área da pele após remoção da camada córnea (escarificação). O método clássico posiciona o paciente sentado para que as soluções instiladas na narina escoem para fora em um recipiente posicionado abaixo do seu queixo. O método modificado posiciona o paciente em posição reclinada para que as soluções instiladas na narina em fluxo reduzido possam ser deglutidas pelo paciente. Ambos os métodos utilizam a perfusão sequencial de soluções eletrolíticas e com drogas, como já descrito, para a avaliação da resposta dos canais de Na^+ (ENaC) e do Cl^- (CFTR) aos diferentes estímulos (**Figura XI**).



Figura X: Paciente sendo submetido à DPN com o método clássico, no CIPED-UNICAMP. Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

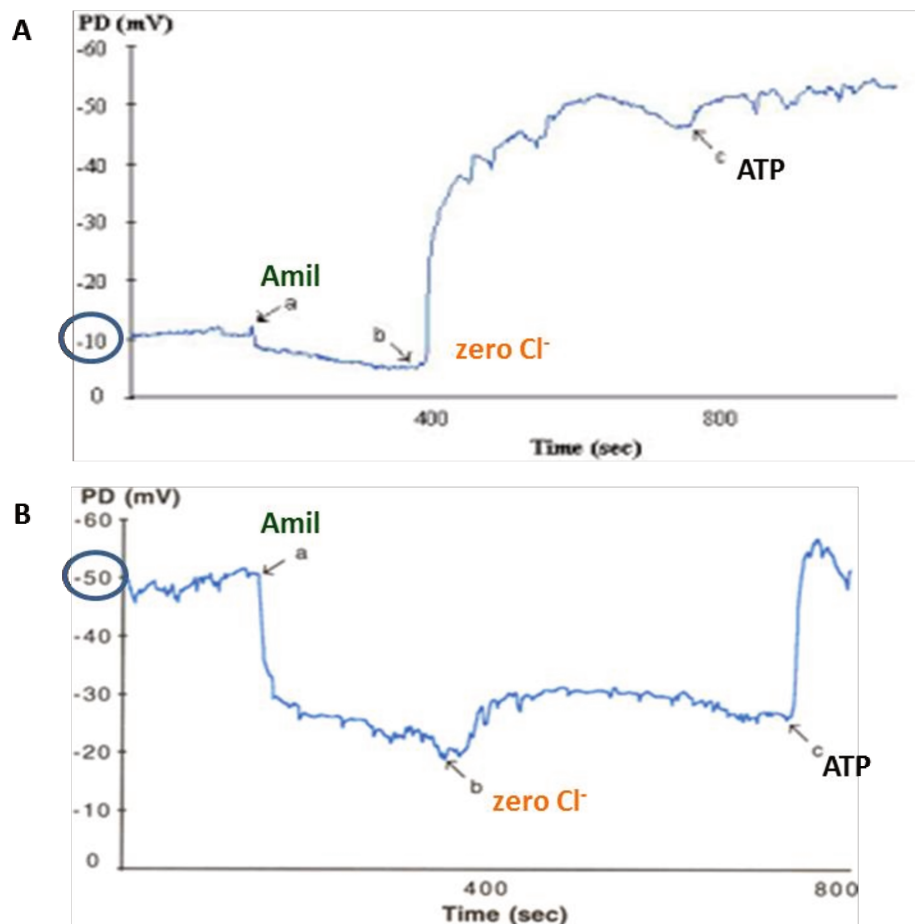


Figura XI: Curvas de resposta da DPN. A) traçado de indivíduo normal B) traçado de indivíduo com FC onde se observa a DPN basal mais negativa (-10mV vs -50mV); a) a despolarização maior do potencial em resposta à perfusão do epitélio com uma solução contendo amilorida (droga bloqueadora do canal de Na^+); b) ausência ou menor hiperpolarização do potencial em resposta ao estímulo da secreção do Cl^- com o uso de uma solução zero mM de Cl^- ; e c) activação menor do canal alternativo de Cl^- activado pelo Ca^{2+} através da aplicação com ATP (comparar a resposta com o traçado do indivíduo normal) (adaptado do site: cfmedicine.com).

5. Avaliação eletrofisiológica da CFTR em biópsia retal por câmara de *Ussing*

A CFTR está presente em abundância no epitélio intestinal, onde se localiza na membrana luminal dos enterócitos (Crawford et al., 1991; Mendes et al., 2004). O trato gastrointestinal é facilmente acessível para estudo, especialmente o reto, onde a CFTR se expressa em grande quantidade, trazendo vantagem para essa técnica. A partir da década de 90 ganham força os estudos de eletrofisiologia utilizando biópsias retais, inicialmente de sucção e posteriormente com pinças endoscópicas. Nos últimos 20 anos, vários grupos de pesquisa têm desenvolvido micro-câmaras de *Ussing* para estudar o defeito de transporte de íons nos tecidos nativos recém-

retirados de indivíduos com FC (Hardcastle et al., 1991; Veeze et al., 1991; Mall et al., 1998a; Taylor et al., 1988).

Medições bioelétricas podem ser aplicadas no epitélio intestinal retal como uma ferramenta de diagnóstico funcional para auxiliar no estabelecimento de um diagnóstico de FC, especialmente nos casos onde os resultados do TS são duvidosos e/ou se CFTR-RD, que não são facilmente identificadas nos testes genéticos.

O mecanismo de secreção do íon Cl^- é eletrogênico, isso permite que a medição da atividade elétrica transintestinal reflita a própria secreção iônica no tecido que é controlada através de estímulos com substâncias secretagogas de ação específica, já previamente conhecidos. Além disso, no intestino de indivíduos com FC esta atividade não está sujeita ao efeito de inflamação, hemorragia ou infecção como nas vias aeríferas, fato que poderia interferir na resposta.

No intestino de indivíduos com FC, a secreção de Cl^- está prejudicada (Taylor et al., 1988), enquanto a de Na^+ e dos nutrientes ligadas ao Na^+ estão aumentadas (Mall et al., 1998b).



Figura XII: Procedimento de coleta da biópsia retal por retossigmoidoscopia no CCA-HC-Unicamp. Arquivo LAFIC-CIPED-UNICAMP.

Os tecidos da superfície da mucosa retal (2-4 mm) são obtidos por dispositivos de sucção ou pinças de biópsias (Hirtz et al., 2004) através de retossigmoidoscopia flexível do cólon ou

endoscopia digestiva alta no caso do intestino delgado (**Figura XII**). São colocadas em meio de cultura refrigeradas e são levadas para avaliação em laboratório nas micro-câmaras de *Ussing*.

O tecido da biópsia é montado nas micro-câmaras de *Ussing* e a atividade elétrica transepitelial pode ser monitorizada quer por medidas de corrente de curto-circuito (I_{cc}) (protocolo de Roterdã, de Jonge et al., 2004) ou medidas de tensão transepitelial (V_{te}), associadas ao cálculo das correntes de curto-circuito (protocolos de Freiburg, Mall et al., 2004a) (**Figuras XIII e XIV**).



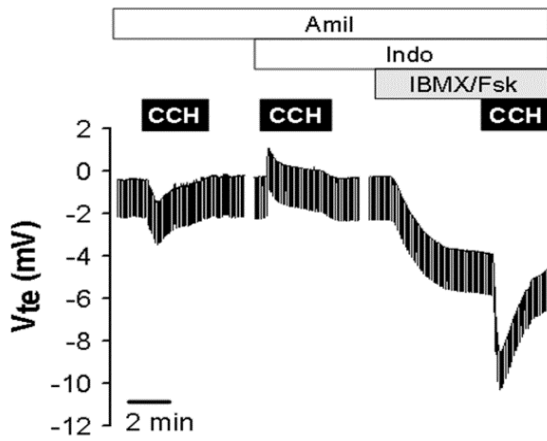
Figura XIII: A) Fragmentos de biópsias. Pinça standard (2.7mm Ø) à esquerda; Pinça jumbo (3.4mm Ø) à direita. B) Inserto com a biópsia. C) micro-câmaras de *Ussing*. Arquivo LAFIC-CIPED-UNICAMP.

No método de Freiburg, adotado por nós, as superfícies luminal e basolateral do epitélio são continuamente perfundidas com solução basal (*Ringer*) sob condições de circuito aberto e sob temperatura controlada, mantendo o tecido viável o maior tempo possível. No protocolo onde se usam as condições de circuito aberto, a voltagem, ou seja, a diferença de potencial entre as membranas luminal e basolateral, é medida por eletrodos de leitura e os dados obtidos são digitalizados pelo dispositivo de aquisição de dados, que funciona também como um voltímetro. A resistência transepitelial (R_{te}) é determinada mediante a aplicação intermitente (cada 5 segundos) de pulsos (duração de 1 segundo) de corrente ($I_{aplicada}=0,5\mu A$). A I_{cc} equivalente (eq- I_{cc}) é então calculada de acordo com a lei de Ohm a partir da V_{te} e da R_{te} (eq- $I_{cc}=V_{te}/R_{te}$) após a correção apropriada tendo em conta a resistência do fluido. O protocolo experimental da sequência de perfusão da biópsia com diferentes drogas para avaliação quantitativa da função do canal CFTR é utilizado de acordo com cada serviço (protocolo de Roterdão ou de Freiburg). Essa técnica permite avaliar de forma indireta, através de medidas bioelétricas, o fluxo de íons e mensurar de forma indireta a atividade dos canais, em particular o da CFTR- Cl^{-} , além de permitir testar drogas *ex-vivo* (**Figura XV**).

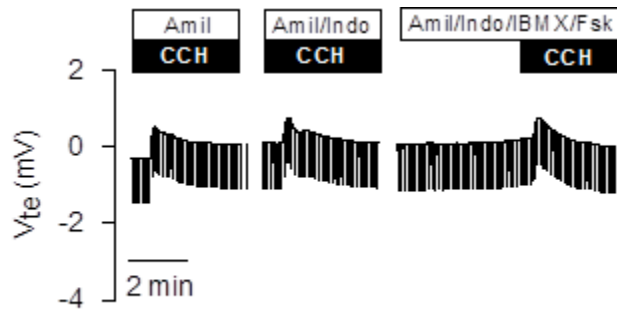


Figura XIV: Gaiola de Faraday com as câmaras de *Ussing* no interior. Arquivo LAFIC-CIPED-UNICAMP.

A



B



C

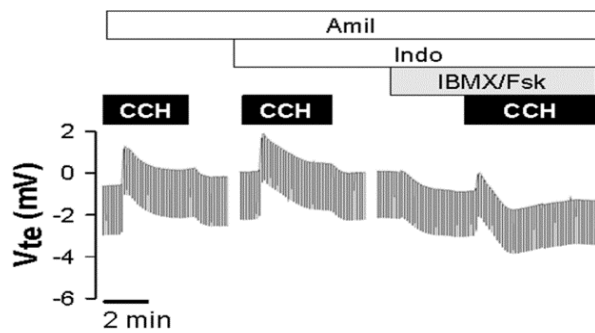


Figura XV: A) Exame normal. B) Exame compatível com FC. C) Exame compatível com resposta residual-FC. Dados de pacientes da Unicamp. Arquivo LAFIC-CIPED-UNICAMP.

É importante a expansão das técnicas de eletrofisiologia, bem como sua adequação para a triagem de drogas moduladoras ou corretoras da CFTR em grande escala. Por isso, têm-se proposto o uso de organóides intestinais, que utilizam epitélios cultivados ao invés de biópsias (Sato et al., 2011). Esta técnica mostrou-se vantajosa para estudos da FC (Dekkers et al., 2013), pois permite a correlação das mutações do *CFTR* com a respectiva função da CFTR-Cl⁻, bem como testar o efeito de novas drogas corretoras e potenciadoras do canal mutadas. Permite também armazenar quantidade suficiente de células para estudos posteriores em bancos de células. Pode-se também cultivar células dos brônquios ou, mais recentemente, do corneto nasal, que para sua expansão utiliza inicialmente um berço de fibroblastos. É seguida da remoção dos fibroblastos sem alterar as células do epitélio respiratório, que mantém sua memória epigenética e retornam ao seu fenótipo diferenciado original, incluindo células ciliadas e células secretoras de muco, formando monocamadas de células epiteliais crescidas como culturas de interface ar-líquido sobre filtros e que formam “tapetes” de células (Liu et al., 2012; Supryniewicz et al., 2012) (**Figura XVI**). Resultados preliminares mostraram que estas células podem ser analisadas em câmara de *Ussing*, à semelhança das biópsias retais (Amaral-Congresso Brasileiro de Pneumologia-Maio 2014) (**Figura XVII**). Este método é promissor, não somente para o teste de drogas de forma geral, mas principalmente porque proporciona a abordagem individualizada, com a identificação da função da CFTR de cada indivíduo com FC e uma possível modulação direcionada, permitindo uma medicina personalizada. Esse objetivo é o que norteia a pesquisa de vários grupos, em particular da Prof. Amaral com quem colaboramos. (**Figura XVIII**).

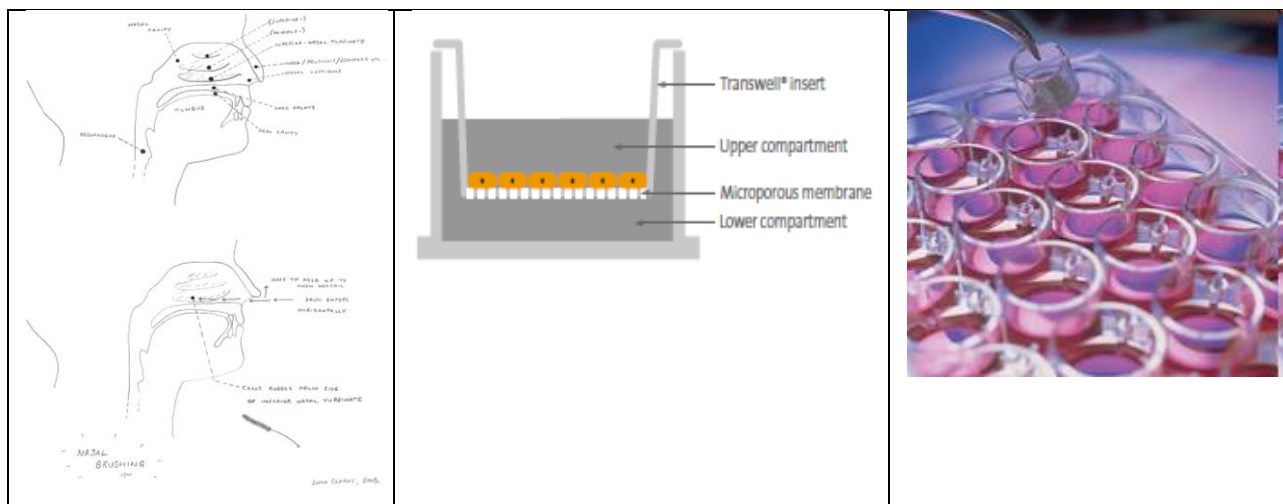
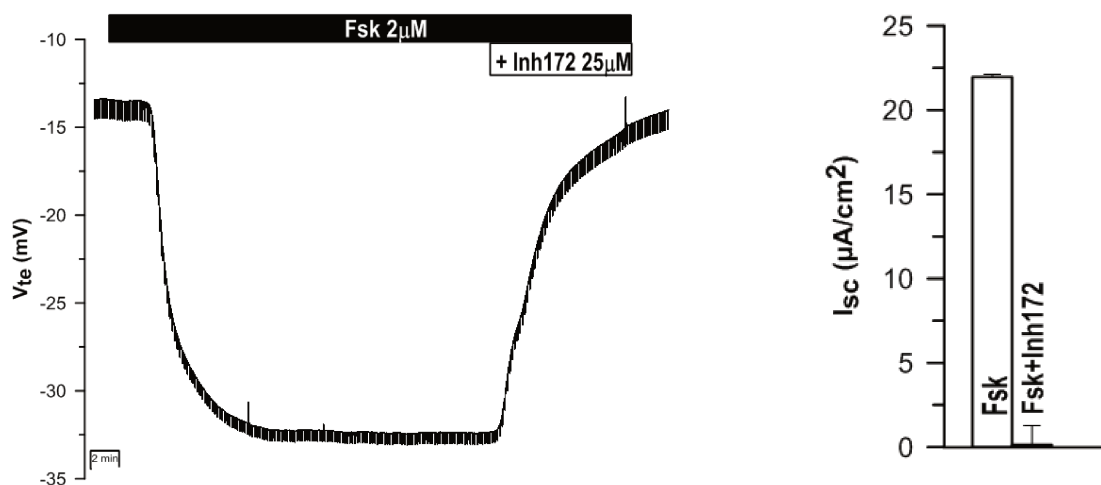


Figura XVI: Esquema da técnica dos escovados nasais, filtros e cultura de interface ar-líquido, respectivamente. Cortesia do Prof. Luka A. Clarke.



Efeito da forskolina para ativar a CFTR em células de epitélio nasal.

Figura XVII: Avaliação da CFTR-Cl⁻ em cultura de células nasais através de correntes de curto circuito sensíveis a Forskolina na micro-câmara de *Ussing*. Experimentos realizados no laboratório da Prof. Amaral, por Inna Uliyakina & Nikhil Awatade (resultados não publicados; Amaral, Congresso Brasileiro de Pneumologia-Maio 2014).

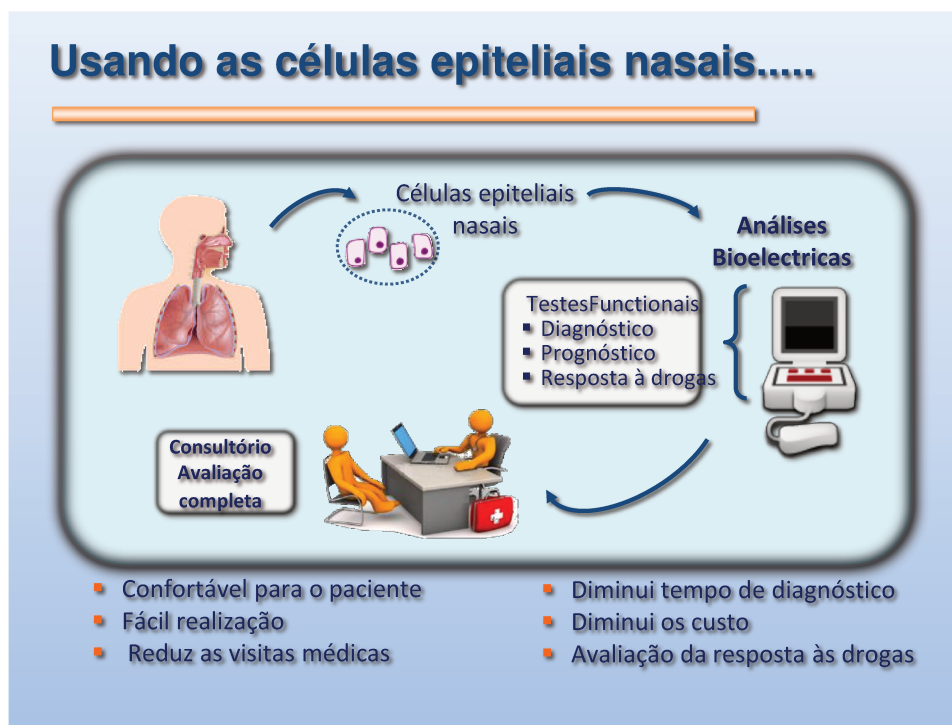


Figura XVIII: Esquema de uma consulta futurista. Sonho por mim compartilhado. Cortesia da Prof. Margarida D. Amaral.

6. Evaporímetro

Este teste detecta, por um aparelho sensível denominado evaporímetro, a taxa de suor na pele. É realizado após protocolo de estimulação β -adrenérgica da glândula sudorípara, que reflete a função da CFTR-Cl⁻. Está baseado nos conhecimentos de que a glândula sudorípara tem dois estímulos para a secreção de suor (**Figuras XIX e XX**): o colinérgico responsável pelo controle da temperatura intrínseca, que apresenta atividade normal nos indivíduos com e sem FC, e o β -adrenérgico, AMPc mediado, com secreção de suor diretamente proporcional à atividade da proteína CFTR-Cl⁻ (Sato & Sato, 1984; Behm et al., 1987), e que está alterado nos pacientes com FC, portadores de 1 mutação (heterozigotos) e com CFTR-RD (Sato & Sato, 1984; Behm et al., 1987; Gonska et al., 2009; Quinton et al., 2012).

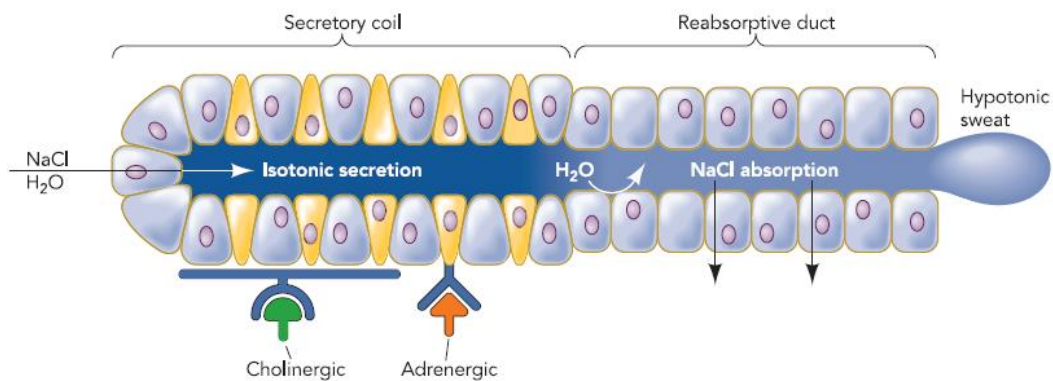


Figura XIX: Esquema que demonstra a glândula sudorípara normal. No paciente com FC não existe resposta ao estímulo β -adrenérgico. (Quinton, 2007).

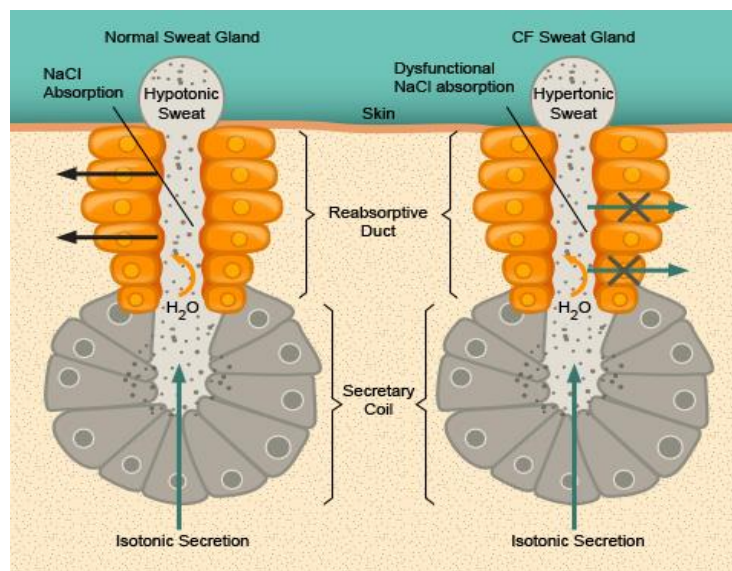


Figura XX: Glândula de suor não indivíduo não FC e glândula de suor de indivíduo com FC. (Quinton, 2007).

A atividade da proteína CFTR pode ser medida através da detecção de quantidades mínimas de suor realizado pelo evaporímetro (**Figura XXI**). No *probe* teste é feita a injeção intradérmica de carbacol que vai estimular inicialmente a secreção de suor por via colinérgica; depois esta via é inibida com a aplicação de atropina; e por fim é feita a aplicação de um beta-coquetel composto por atropina e isoproterenol, associado à aminofilina, que será responsável pela estimulação da CFTR como canal de Cl^- . No probe controle é feito a injeção somente de atropina no momento 1 do exame. Após todas as aplicações é realizada a medição de suor pelo equipamento durante cerca de 8-10 minutos por fase. Coquetel

Os pacientes portadores de FC não apresentam sudorese após o estímulo com o beta-coquetel; os pacientes com uma mutação apresentam cerca de 50% de sudorese quando comparada a fase colinérgica; e os pacientes sem nenhuma mutação possuem a curva de sudorese semelhante a da fase colinérgica (Gonska et al., 2009; Quinton et al., 2012) (**Figuras XXII, XXIII, XXIV e XXV**). É realizado cálculo da relação sudorese pelo estímulo β -adrenérgico e a sudorese pelo estímulo colinérgico (vide **tabela II**).

Protocolo para realização do teste do evaporímetro:

4 injeções intradérmica (ID) (**Figuras XXI, XXII, XXIII, XXIV e XXV**)

- 1) No probe controle (traçado azul) - aplicar 0,2ml de atropina ID → inibe a secreção colinérgica (momento 1)
- 2) No probe teste (traçado vermelho) - 0,1ml de carbacol ID → estimula a secreção colinérgica (momento 1)
- 3) No probe teste (traçado vermelho) - 0,2 ml de atropina ID → inibe a secreção colinérgica (momento 2)
- 4) No probe teste (traçado vermelho) - 0,2ml de β -coquetel * ID → estimula a secreção β -adrenérgica relacionada com a CFTR. (momento 3)

* β -coquetel (atropina+ aminofilina+ isoproterenol)

Tabela II - Tabela dos valores de normalidade para o cálculo dos resultados do teste com evaporímetro para os indivíduos saudáveis, sem nenhuma mutação (*healthy*), portadores de 1 mutação do gene *CFTR* (*hetero*) e FC (*CF*) de acordo com o sexo. (Quinton et al., 2012).

	Healthy		Hetero		CF (PS and PI)	
	β peak	Ratio β /chol	β peak	Ratio β /chol	β peak	Ratio β /chol
Men	60(50-65)	0.8 (0.7;0.9)	40(25-55)	0.5 (0.4;0.7)	<4.5	0
Women	40(30-50)	0.75 (0.6;0.9)	15(10-30)	0.4 (0.3;0.45)	<4.5	0

Beta-adrenergic Sweat Secretion as a Diagnostic Test for Cystic Fibrosis Am. J. Respir. Crit. Care Med. rccm.201205-0922OC. First published online August 2, 2012



Figura XXI: Paciente de 9 anos sendo submetido ao teste do evaporímetro no CIPED-UNICAMP. Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

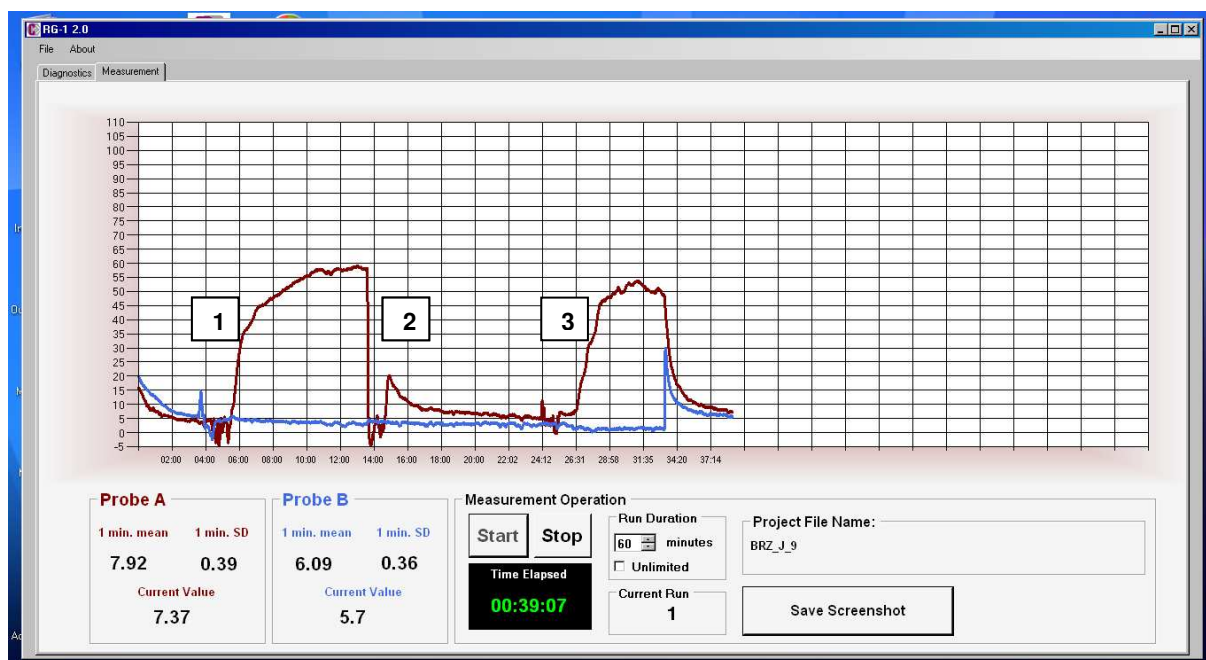


Figura XXII: Traçado de um indivíduo saudável, sem nenhuma mutação. No momento 3, há resposta à estimulação β -adrenérgica com sudorese e curva semelhante a da estimulação colinérgica (momento 1), após a inibição do estímulo colinérgico com atropina (momento 2). Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

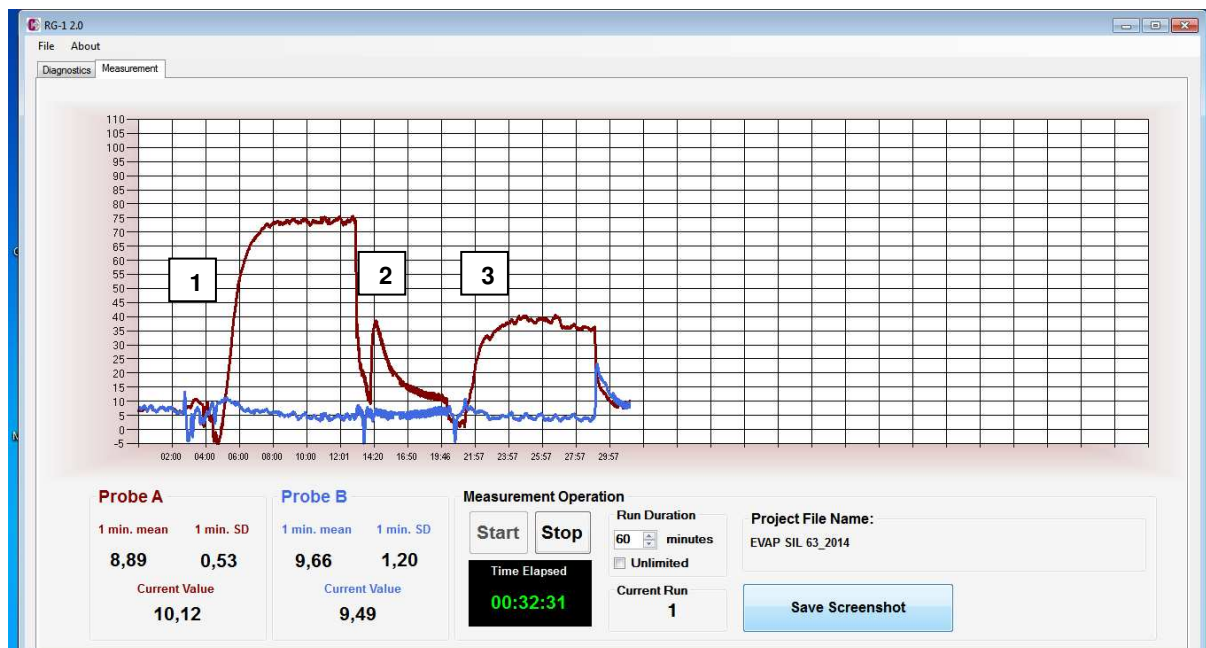


Figura XXIII: Traçado de um indivíduo portador de uma mutação. No momento 3, há resposta parcial à estimulação β -adrenérgica com sudorese cerca de 50% após a estimulação colinérgica (momento 1), que se segue a inibição do estímulo colinérgico (momento 2). Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

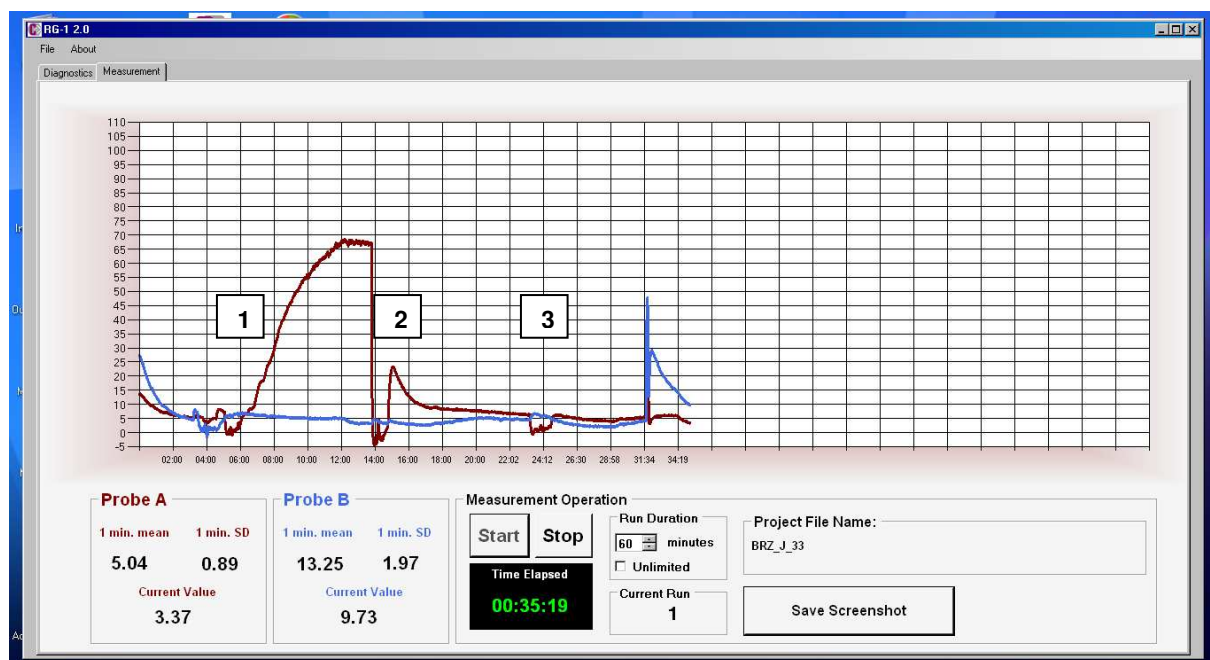


Figura XXIV: Traçado de um indivíduo com FC. No momento 3, não há resposta à estimulação β -adrenérgica (após a injeção do β -coquetel). Não há sudorese como na curva da estimulação colinérgica (momento 1), o traçado permanece uma linha reta. Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

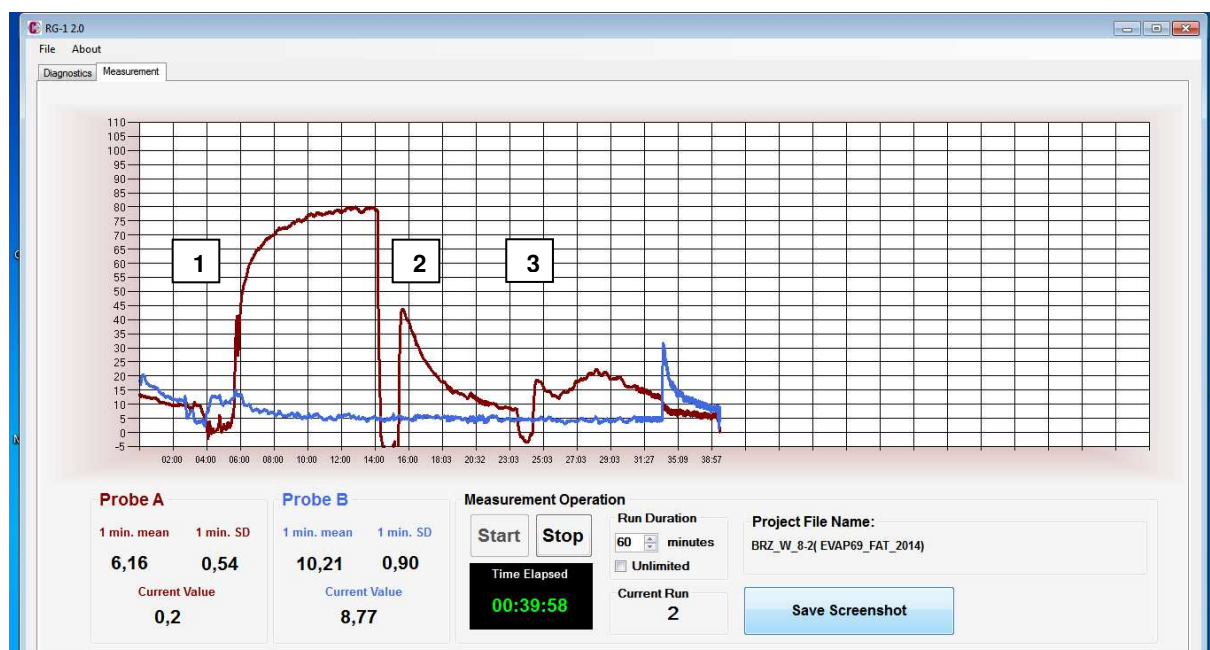


Figura XXV: Traçado de um indivíduo com CFTR-RD. No momento 3, há resposta parcial à estimulação β -adrenérgica com sudorese cerca de 20% após a estimulação colinérgica (momento 1), que se segue a inibição do estímulo colinérgico (momento 2). Arquivo LAFIP-CIPED-UNICAMP.

7. Caracterização genética da FC: o gene CFTR

A FC é uma doença genética com padrão de herança autossômico recessivo, sendo necessária a herança materna e paterna de um alelo mutado para sua ocorrência na prole. Quando cada um dos pais tem um gene para a FC, em cada gestação, o risco de nascer um filho com e sem a doença é de 25% e 75%, respectivamente. A probabilidade de nascer um filho saudável, portador de um gene para FC, é de 50%. Deve-se ter em mente esses dados para orientar futuras gestações das mães dos pacientes (Ribeiro, Ribeiro & Ribeiro, 2002).

A FC é causada por mutações no gene *CFTR*, localizado na região 7q3.1, constituído por 27 exons (Riordan et al., 1989) que codificam um RNAmensageiro (RNAm) de 6,5 quilobases, e que transcreve uma proteína transmembranar, reguladora do transporte iônico (CFTR), composta por 1.480 aminoácidos e que age como canal de Cl^- (Riordan et al., 1989) (**Figura XXVI**).

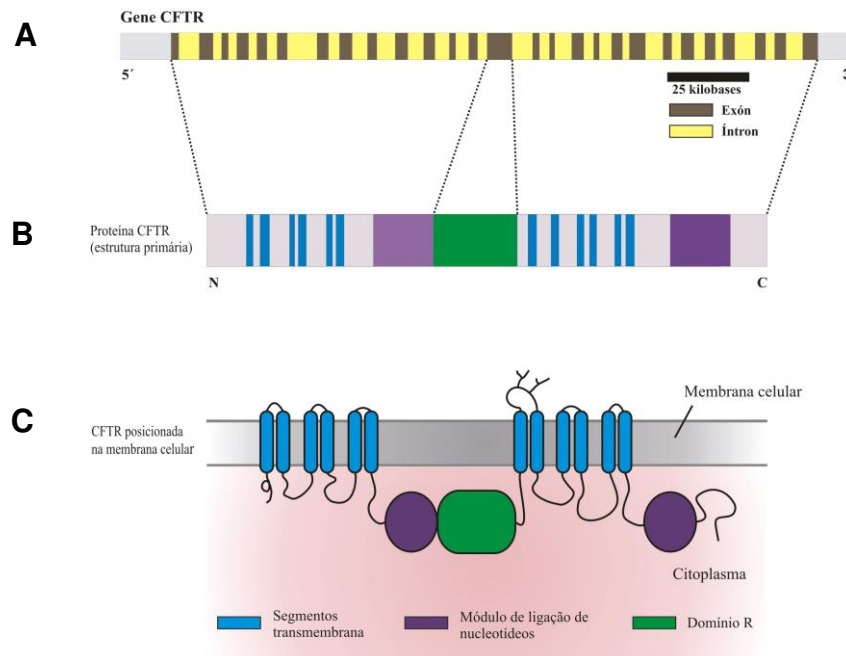


Figura XXVI: A. Esquema do gene *CFTR* contendo em (amarelo) os íntrons e em (marron) os éxons. B. Esquema do RNAm antes da maturação demonstrando a sequência que origina os diferentes constituintes da proteína CFTR madura, os íntrons estão demonstrados em (cinza), e as diferentes subunidades da proteína nas cores segundo o esquema C. C. Proteína CFTR na membrana plasmática com seus diferentes constituintes, a saber: (azul) segmentos transmembrana (TMD1 e TMD2), (verde) módulo de regulação (RD), e em (roxo) módulo de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2). Cortesia de Fernando Marson – Dissertação de Mestrado. FCM-UNICAMP (2013).

É sintetizada no núcleo, sofre maturação em organelas citoplasmáticas (fosforilação e glicosilação), localizando-se na membrana apical das células epiteliais. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de Cl^- , Na^+ , HCO_3^- e água (Ribeiro, Ribeiro & Ribeiro, 2002).

A mutação mais frequente responsável pela FC é a deleção de uma fenilalanina no resíduo 508 da proteína (F508del), que leva a deficiência no dobramento da CFTR e, posteriormente, degradação no retículo endoplasmático rugoso (Amaral & Kunzelmann, 2007). Tal alteração está presente em 70 a 95% dos alelos responsáveis pela FC em países do leste europeu. No Brasil, essa alteração contribui com aproximadamente de 50% dos alelos responsáveis pela doença nas regiões sul e sudeste (Raskin et al.1993; Marson et al., 2013). A baixa porcentagem quando comparada aos países europeus que colonizaram o Brasil e que contribuíram de forma importante na composição genética dessas regiões brasileiras, reflete o alto índice de miscigenação racial característico de nosso país (Suarez-Kurtz et al., 2005). Além da F508del, aproximadamente 2000 outras mutações foram descritas no gene *CFTR* e mais de 1500 associadas ao fenótipo (**genet.sickkids**).

Algumas mutações predisõem a maior gravidade clínica, sendo 42% das mutações de sentido trocado; em 16% dos casos, há erro na matriz de leitura, levando a uma proteína truncada; 12% são mutações no sítio de emenda do RNA; 10% mutações sem sentido, gerando sítio de parada da transcrição do DNA; 5% são grandes inserções ou deleções de material genético e 15% das alterações são variações da sequência do DNA (polimorfismos) e não acarretam alteração para a FC (Kuhnl & Faucz, 2005).

As mutações da FC foram divididas em seis classes (**Figura XXVII**) de acordo com o efeito que causam na expressão em nível celular da proteína CFTR. As classes I a III apresentam fenótipo mais grave, já que englobam mutações que levam à não produção da proteína CFTR ou à produção de proteína inativa (Zielenski & Tsui, 1995; Haardt et al., 1999).

Classes						
Normal	I	II	III	IV	V	VI
						
Consequência	Sem síntese	Bloqueio no processamento	Bloqueio no transporte iônico	Alteração da condutância	Síntese reduzida	Degradação precoce (pouco tempo de permanência na MP)
Tipo de mutação (exemplo)	Sem sentido e mudança da matriz de leitura (G542X)	De sentido trocado e deleção de aminoácido (F508del)	De sentido trocado (G551D)	De sentido trocado (R334W)	De formação de sítio alternativo de <i>splicing</i> (3849+10Kb C>T)	Mutações que levam a formação de C-terminal truncada (Q1412X)

Figura XXVII: As seis classes de mutações que causam FC, suas consequências e exemplos, onde MP = membrana plasmática. Adaptado de Zielenski & Tsui, 1995 e Haardt et al., 1999.

Mutações de Classe I causam defeitos na síntese da proteína gerando proteínas truncadas que são degradadas. Isso ocorre devido a alterações nos sinais de encadeamento do *splicing*, mudanças de fase de leitura ou sem sentido, alelos *nonsense*, ou devido a formação de códon de parada prematura que levam a degradação do RNAm (Amaral & Kunzelmann, 2007).

Mutações de Classe II alteram os eventos de processamento e maturação da proteína, com consequente retenção no retículo endoplasmático e rápido envio para degradação. A mutação mais comum, F508del, pertence a esta classe (Welsh & Smith, 1993). As mutações de classe III afetam o domínio regulatório do canal, incapacitando o processo de abertura (Salvatore et al., 2002).

As mutações agrupadas nas três últimas classes (IV, V e VI) estão associadas com secreção residual de Cl^- , em geral, superior a 10% do normal em valores para biopsia retal avaliados em câmara de *Ussing*. No entanto, níveis de expressão de pelo menos 5% de RNAm normal estão associados ao melhor prognóstico da doença (Ramalho et al., 2002). As mutações de classe IV produzem uma proteína que chega corretamente na membrana e responde a estimulação por ATP, porém o fluxo de íons Cl^- é reduzido (Amaral & Kunzelmann, 2007). As mutações de classe V produzem quantidade reduzida da proteína normal de forma que pequenos níveis funcionais são alocados na membrana (Rowntree & Harris, 2003). Mutações de *splicing* alternativo que produzem pequena porcentagem de RNAm normal estão dentro desta categoria.

As mutações de classe VI levam a produção de proteínas que possuem tempo de permanência reduzido na membrana apical das células devido a baixa estabilidade (Haardt et al., 1999).

Além das mutações, Mekus e colaboradores (2000), estudando polimorfismos em famílias com irmãos gêmeos com FC, determinaram que além das mutações no gene *CFTR*, polimorfismos em outros genes, somados ao meio ambiente, atuam modificando a expressão clínica da FC. São vários os genes que atuam modulando a gravidade clínica da FC acarretando um amplo espectro fenotípico (Cutting, 2000; Marson et al., 2014).

7.1. Métodos para análise das mutações

Os métodos moleculares para a detecção de mutações no gene *CFTR* se baseiam no conhecimento atual que se tem sobre a patologia molecular da CFTR e estão sempre em evolução, sendo dependente das ferramentas moleculares disponíveis para a detecção das mutações. Atualmente, se conhece ampla variedade de técnicas que podem ser utilizadas para identificar as variações na sequência do gene *CFTR* e não existe um padrão-ouro para testes de rotina (Dequeker et al., 2009). Os laboratórios devem estar cientes das limitações do método utilizado e conhecer as mutações que não são identificadas. Isso significa que cada laboratório deve escolher um método, que seja adequado para a sua experiência, carga de trabalho e escopo dos testes, além de avaliar os custos para a realização dos mesmos. Nesse contexto, deve-se salientar que no Brasil a cobertura financeira para a genotipagem na TNN é de aproximadamente R\$ 70,00 por paciente (Marson et al., 2014).

Os métodos utilizados na genotipagem de *CFTR* podem ser divididos em dois grupos: i) aqueles dirigidos a mutações conhecidas, ou seja, testes de DNA para a presença ou ausência de mutação(s) específica(s); e ii) métodos de verificação para mutações desconhecidas (por exemplo, o sequenciamento dos exons do gene *CFTR*) e que devem incluir a procura de grandes rearranjos desconhecidos da *CFTR*, incluindo grandes deleções, inserções e duplicações. Estes são realizados por PCR (reação em cadeia da polimerase) semi-quantitativos. A amplificação deve ser realizada de forma adequada utilizando-se de técnicas com alta sensibilidade para reduzir o nível de falso negativo, no caso da amplificação convencional. É preciso estar atento às atualizações regulares com o advento de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração. Deve-se levar em conta também a população estudada e a origem dos kits de análise de mutações específicas utilizados, que diferem de acordo com a procedência (Europa e EUA). Deve-se iniciar estudando as mutações mais frequentes em uma determinada população. Isto

diminui os custos e agiliza o diagnóstico. Habitualmente no sequenciamento se estuda os exons e se necessário os introns na sequência (Dequeker et al., 2009).

Algumas técnicas moleculares têm ganhado evidência por facilitar e otimizar o diagnóstico genético. Podem ser utilizadas em pacientes mesmo no caso da TNN, com realização dos testes em amostras de papel de filtro do teste do pezinho, o que já é realidade em muitos países. Um exemplo é a análise de hibridização *in situ* por microarranjo de DNA (conhecida como *microarray-on-a-chip*), que pesquisa um número pré determinado de mutações conhecidas, detectando as mutações mais frequentes de uma determinada população, de forma rápida e prática (**Figura XXVIII**). Hoje, contamos com bancos digitais de fácil acesso para consulta da correlação das mutações conhecidas e sua expressão clínica (**Figura XXIX – CFTR2 website**).

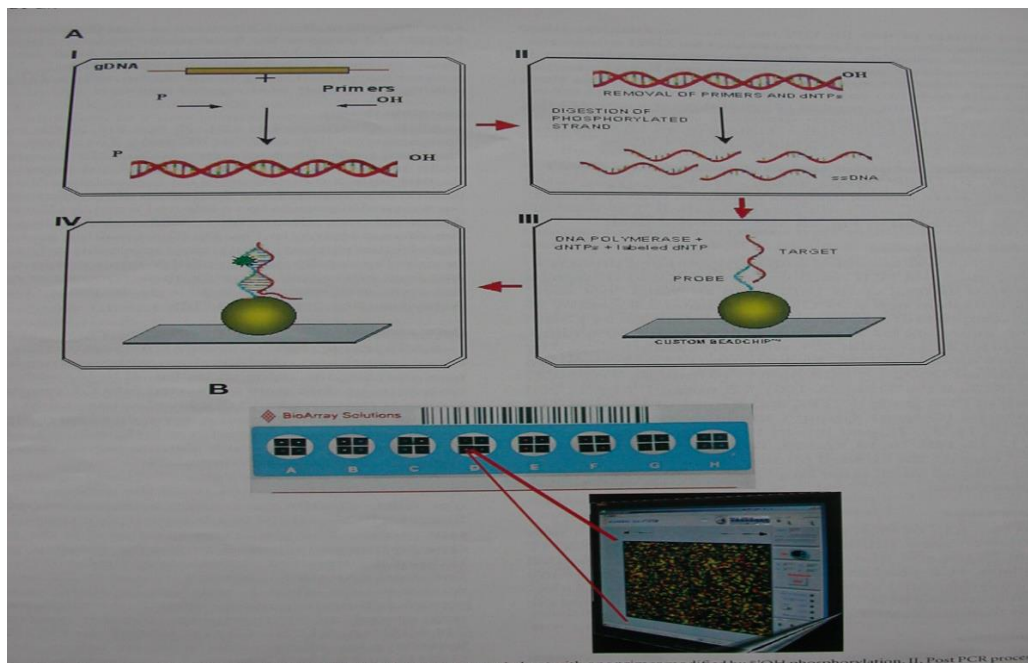


Figura XXVIII: Técnica de microarranjo de DNA.

The CFTR2 Website

The screenshot shows the CFTR2 website interface. At the top, there are logos for the CFTR2 project, Clinical and Functional Translation of CFTR, Cystic Fibrosis Foundation, Johns Hopkins Medicine, and Sequenom CMM. Below the logos, there are 'Quick Links' and 'Tools' sections. The main content area is titled 'List of mutations for which the information has recently changed'. It includes a brief explanation and a table of mutations.

Mutation	New nomenclature (protein)	New nomenclature (nucleotide)	Mutation summary (FORMER)	Mutation summary (CURRENT)	Date of change
711+5G->A	No protein name	c.579+5G>A	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
R668C	p.Arg668Cys	c.2002C>T	Mutation of varying clinical consequences	Non CF-causing mutation	7/22/2013
G576A	p.Gly576Ala	c.1727G>C	Mutation of varying clinical consequences	Non CF-causing mutation	7/22/2013
3120G->A	No protein name	c.2988G>A	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
L997F	p.Leu997Phe	c.2991G>C	Mutation of varying clinical consequences	Non CF-causing mutation	7/22/2013
711+3A->G	No protein name	c.579+3A>G	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
I1234V	p.Ile1234Val	c.3700A>G	Mutation of varying clinical consequences	Mutation of unknown significance	7/22/2013
R31C	p.Arg31Cys	c.91C>T	Mutation of unknown significance	Non CF-causing mutation	7/22/2013
P205S	p.Pro205Ser	c.613C>T	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
H199Y	p.His199Tyr	c.595C>T	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
1898+3A->G	No protein name	c.1766+3A>G	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
1717-8G->A	No protein name	c.1585-8G>A	Mutation of unknown significance	CF-causing mutation	7/22/2013
R1162L	p.Arg1162Leu	c.3485G>T	Mutation of unknown significance	Non CF-causing mutation	7/22/2013
V754M	p.Val754Met	c.2260G>A	Mutation of unknown significance	Non CF-causing mutation	7/22/2013

At the bottom left, there is a 'Site Settings' section with a checkbox for 'Scientific/medical view' and a 'How can you help us improve the web site?' link. The URL <http://www.cftr2.org/> is displayed at the bottom.

Figura XXIX: CFTR2: Site que correlaciona o fenótipo das mutações já estudadas com outras menos conhecidas.

III. A proteína CFTR

O conhecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é fundamental para se compreender a sua importância e função. A CFTR é uma proteína que hoje já foi amplamente estudada, sua estrutura destrinchada e hoje pode ser facilmente demonstrada por técnica de raios-X por cristalografia. É composta por 1480 aminoácidos com dois domínios intracelulares de ligação a nucleótidos NBD1 e NBD2 (do inglês, *Nucleotide Binding Domain*), dois domínios transmembrana, TMD1 e TMD2 (do inglês, *Transmembrane Domain*) e um regulador, o RD (do inglês, *Regulatory Domain*) (**Figura XXX**). Embora hoje o conhecimento estrutural da CFTR esteja bem estabelecido, avaliar sua função e expressão nos diferentes órgãos ainda é um desafio (Odolczyk & Kiewicz, 2014).

Além da função da CFTR como canal de Cl⁻, também tem sido demonstrado que esta proteína regula vários canais e transportadores, comandando assim o transporte de íons em muitos epitélios. A CFTR é expressa em membranas luminiais de ambas as membranas secretoras

e absorptivas, desempenhando um papel importante no fluxo de eletrólitos nos canais via AMPc e ativados por Cálcio (Ca^{2+}) (**Figura XXXI**).

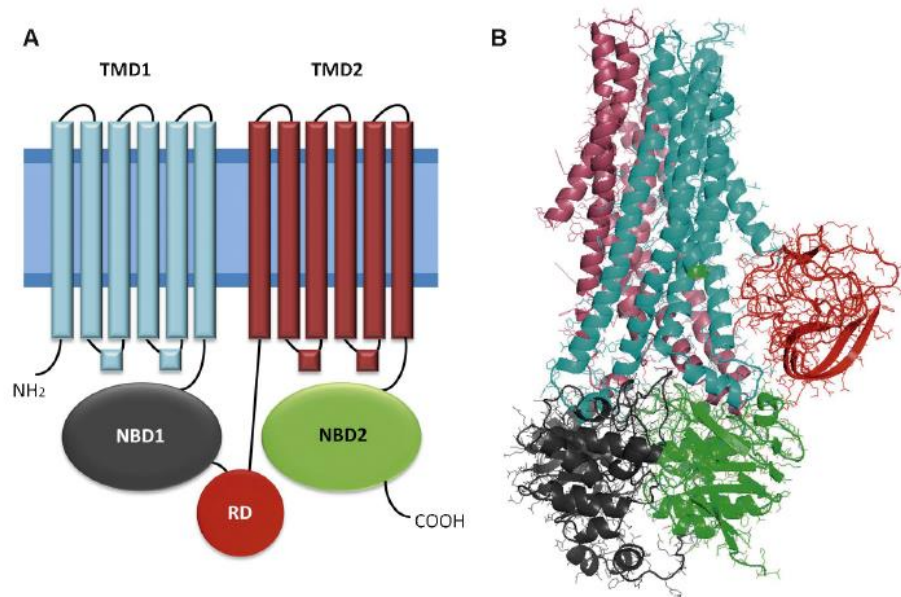


Figura XXX: Estrutura da CFTR esquemática e em tridimensional. (Norbert et al., 2014).

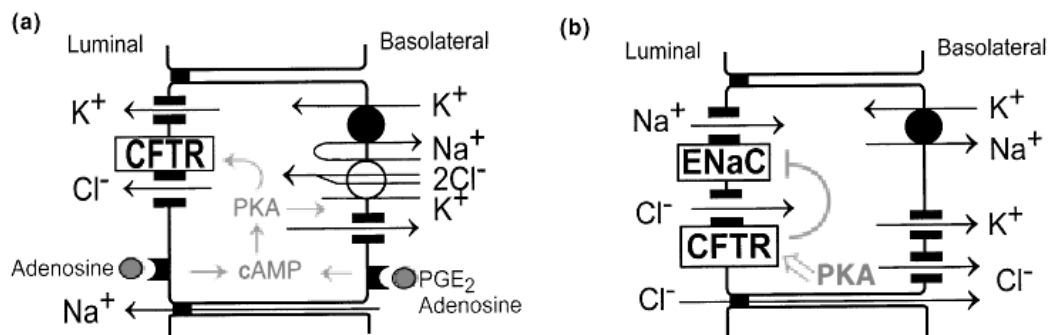


Figura XXXI: CFTR e interação com outros canais e receptores em células epiteliais. (Mall & Kunzelmann, 2000).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliação dos métodos de diagnóstico: clínico, teste do suor, genético (mutações do gene CFTR), e o estudo bioelétrico em biópsias retais quanto à função da CFTR para o diagnóstico de FC.

Objetivos específicos:**Capítulo 1**

Estabelecer a medição da secreção de Cl^- mediada pela CFTR em biópsias retais como um biomarcador para diagnóstico e prognóstico da FC

Avaliar qual a melhor medida discriminatória entre os testes laboratoriais e clínicos para a distinção entre o fenótipo clássico, não clássico e não FC.

Capítulo 2

Avaliar a viabilidade das amostras obtidas por pinças de biópsia durante a retossigmoidoscopia flexível para análises bioquímicas e bioelétricas “*ex vivo*” em câmara de *Ussing*.

Avaliação global do procedimento de biópsia retal a partir de uma perspectiva técnica (tipo de preparo e sedação e presença de complicações) e a partir da perspectiva dos pacientes com a avaliação do grau de desconforto.

Capítulo 3

Avaliar as etapas da realização do TS em serviços capacitados para o diagnóstico de FC em um estado do Brasil (SP).

3. CAPÍTULO

3.1. Capítulo 1: Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis

Manuscript was published in *PLoS One* (2012) and included here with minor alterations:
Sousa M, **Servidoni MF**, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V, Ribeiro MA, Uliyakina I, Marson FA, Kmit A, Cardoso SR, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Sousa L, Kunzelmann K, Ribeiro AF, Amaral MD.
Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One.* (2012); 7(10):e47708.

3.1.1 Summary

Background: Cystic Fibrosis (CF) is caused by ~1,900 mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene encoding for a cAMP-regulated chloride (Cl⁻) channel expressed in several epithelia. Clinical features are dominated by respiratory symptoms, but there is variable organ involvement thus causing diagnostic dilemmas, especially for non-classic cases.

Methodology/Principal Findings: To further establish measurement of CFTR function as a sensitive and robust biomarker for diagnosis and prognosis of CF, we herein assessed cholinergic and cAMP-CFTR-mediated Cl⁻ secretion in 524 freshly excised rectal biopsies from 118 individuals, including patients with confirmed CF clinical diagnosis (n=51), individuals with clinical CF suspicion (n=49) and age-matched non-CF controls (n=18). Conclusive measurements were obtained for 96% of cases.

Patients with "Classic CF", presenting earlier onset of symptoms, pancreatic insufficiency, severe lung disease and low Shwachman-Kulczycki scores were found to lack CFTR-mediated Cl⁻ secretion (<5%). Individuals with milder CF disease presented residual CFTR-mediated Cl⁻ secretion (10-57%), non-CF controls show CFTR-mediated Cl⁻ secretion ≥30-35% and data evidenced good correlations with various clinical parameters. Finally, comparison of these values with those in "CF suspicion" individuals allowed to confirm CF in 16/49 individuals (33%) and exclude it in 28/49 (57%). Statistical discriminant analyses showed that colonic measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion are the best discriminator among Classic/Non-Classic CF and non-CF groups.

Conclusions/Significance: Determination of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in rectal biopsies is demonstrated here to be a sensitive, reproducible and robust predictive biomarker for

the diagnosis and prognosis of CF. The method also has very high potential for (pre-) clinical trials of CFTR-modulator therapies.

Keywords: CFTR function; CF biomarkers; outcome measures innovative therapeutics; diagnosis-algorithm prediction.

3.1.2 Introduction

Cystic Fibrosis (CF), the most common severe autosomal recessive disease in Caucasians, is caused by mutations in the *CF transmembrane conductance regulator (CFTR)* gene (Rommens et al., 1989; Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989) which encodes a cAMP-regulated chloride (Cl⁻) channel expressed at the apical membrane of epithelial cells to control salt and water transport (Rich et al., 1990). Clinically, CF is characterized by multiple manifestations in different organs, but is dominated by the respiratory disease, the main cause of morbidity and mortality. Airway obstruction by thick mucus and chronic infections, especially by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), eventually lead to impairment of respiratory function (Rowe et al., 2005). Other CF symptoms include pancreatic insufficiency, intestinal obstruction, elevated sweat electrolytes and male infertility (Collins, 1992). About 1,900 CFTR mutations were reported, but one (F508del) found in association with severe CF, accounts for ~70% of CF chromosomes worldwide (Collins, 1992). Despite impressive advances in our understanding of the molecular basis of CF, life expectancy and quality of life for CF patients are still limited (Rowe et al. 2005).

For the vast majority of patients, the diagnosis of classic forms of CF is established early in life and suggested by one or more characteristic clinical features, a history of CF in a sibling or, more recently, by a positive newborn screening result (Rosenstein & Cutting 1998; Farrell et al. 2008). Such diagnosis is usually supported by evidence of CFTR dysfunction through identification of two CF-disease causing mutations, two abnormal sweat-Cl⁻ tests (≥ 60 mEq/L), and/or distinctive transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008).

However, depending on the ethnic background of the populations tested (Bobadilla, Macek Jr., Fine & Farrell, 2002) there is a fraction of patients escaping such diagnosis criteria by presenting "non-classic" symptoms, i.e., milder disease and often inconclusive evidence of CFTR dysfunction from the available diagnostic tools (De Boeck et al., 2006; Boyle, 2003). For such individuals with clinical phenotypes not fully meeting the CF diagnostic criteria it is also difficult to exclude CF. These have been described as having "CFTR-opathies" (Noone & Knowles, 2001)

or CFTR-related disorders (CFTR-RD) (Bombieri et al., 2011; Paranjape & Zeitlin, 2008). Moreover, the recently implemented extensive newborn screening programs identify increasing numbers of asymptomatic CF patients merely identified by elevated serum concentrations of immunoreactive trypsinogen (IRT), posing new challenges to the CF diagnosis paradigm (Farrell et al., 2008; Parad & Comeau, 2005; Taylor et al., 2009), especially when associated with borderline sweat $[Cl^-]$ and/or inconclusive *CFTR* genotypes (Boyle, 2003; Parad & Comeau, 2005; Taylor et al., 2009; De Boeck et al. 2006). To confirm/exclude a CF diagnosis in such increasing numbers of individuals, besides close clinical follow-up, further laboratory support is required (Taylor et al., 2009), in particular, there is a need for robust methods relying on the functional assessment of CFTR.

Assessment of CFTR (dys)function in native colonic epithelia *ex vivo*, as we previously reported, constitutes a good approach to this end (Mall et al., 2004a; Hirtz et al., 2004). However, since those data were reported, other groups have investigated the abnormalities in electrogenic Cl^- secretion in the intestinal epithelium of CF patients using Ussing chamber measurements by different protocols (van Barneveld et al., 2006; Derichs et al., 2010; van Barneveld et al., 2010). Unfortunately, the final composite parameter used by some, results from a combination of experimental readouts not all relying on direct measurement of CFTR-mediated Cl^- secretion, thus leading to conflicting results and precluding good correlations with clinical symptoms (van Barneveld et al., 2006; Derichs et al., 2010; van Barneveld et al., 2010).

Since our previous results have established that quantification of rectal CFTR-mediated Cl^- secretion is a sensitive test for the diagnosis and prognosis of CF disease (Hirtz et al., 2004), hereunder we applied it to the largest cohort of CF patients and highest number of rectal biopsies ever assessed in a single study analyzing CFTR-mediated Cl^- secretion in native tissue *ex vivo* to evaluate its robustness as a diagnosis/prognosis biomarker. Our current data demonstrate significant correlations with CF clinical symptoms, evidencing the value of this method as a superior laboratory tool to aid the clinical practice. Furthermore, here we also applied this technique to individuals with clinical suspicion of CF to confirm/exclude a CF diagnosis. Through comparison of the values for CFTR-mediated Cl^- secretion in these individuals to those both of the CF reference group and of a non-CF control group, we could confirm CF in 16/49 individuals (33%) and exclude it in 28/49 (57%), remaining 5 inconclusive. Finally, using the Ussing chamber data in statistical discriminant analyses, together with the clinical outcomes and other laboratory measurements, has shown that colonic measurements of CFTR-mediated Cl^-

secretion, alone or in combination with sweat-Cl⁻ and fecal elastase E1 (FEE), provides the best discriminator factor among patients with Classic CF, Non-Classic CF and non-CF individuals.

3.1.3 Methods

Ethics Statement and Subjects

Access to human tissues used in this study received approval from the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp, ref. 503/2007 – **Annex A**). Signed informed consent was obtained from all patients (or parents/tutors, for those <18 yrs – **Annex B**). Altogether 524 freshly excised rectal biopsies were analysed from 118 Brazilian individuals, including CF patients with confirmed diagnosis (n=51), individuals with CF clinical suspicion (n=49) and age-matched non-CF controls (n=18) undergoing biopsing with no CF-related disorders and agreeing to participate in the study. Conclusive results were obtained for 113/118 subjects, i.e., 96% of the cases.

Clinical Assessment

Patient data collected included (**Appendix A: Table 1-A and 1-B**): age at diagnosis, sweat Cl⁻ values (≥ 2), body mass index (BMI), Shwachman-Kulczycki (SK) scores, pancreatic status and pulmonary function. Additional clinical features included presence of meconium ileus (MI), nasal polyposis, glucose intolerance, diabetes, osteopenia, osteoporosis, hepatic involvement and lung pathogens. Criteria for glucose intolerance and diabetes were as defined by the American Diabetes Association (2003) by performing the 2h-oral 75g-glucose tolerance test: when glucose levels were 140-199 mg/dL, glucose intolerance was assigned and when above 200 mg/dL diabetes was considered. Criteria for osteopenia and osteoporosis were as defined by the T-score for bone mineral density as recommended by the World Health Organization (Kanis & Glüer, 2000): osteopenia was assigned for values between -1.0 and -2.5 and below -2.5 it was considered osteoporosis. Regarding the "hepatic involvement" we used previously defined criteria (Debray et al., 2011) i.e., patients presenting either hepatic steatosis, biliary lithiasis and also chronic liver disease. In most cases, liver disease was initially characterized by hepatic steatosis, and ultimately there was biliary cirrhosis and portal hypertension (Debray et al., 2011). Ultrasound exams were used to confirm these clinical findings, analyzing liver parenchyma echogenicity and evidence for portal hypertension (Debray et al., 2011). Blood analysis also

showed increased values for liver transaminases and γ -glutamyl transferase (>1.5 fold at least for 6 months).

Measurements of sweat Cl^-

For sweat collection, we used the quantitative pilocarpine iontophoresis method, which remains the gold standard for this approach, and sweat was obtained from the flexor surface of either forearm of the individual. Sweat was collected on to pre-weighed Cl^- -free filter paper for 20-30 min. A minimum sweat rate of 1 g/m^2 body surface area/min was required; thus a minimum of 150 mg of sweat was considered adequate (Taylor et al., 2009). Values for Cl^- or Na^+ concentrations above 160 mmol/l were discarded as not physiological and sweat test repeated. Internal quality control procedures were based on the usage of standard solutions (BioClinTM, Pretoria, South Africa) and also samples from individuals with negative and positive sweat tests. The coefficient of variation (CV) was of 15mmol/l. Thereafter, colorimetric technique was used to determine the concentration (in mmol/L) of both Na^+ and Cl^- in sweat (Taylor et al., 2009). Sweat $[\text{Cl}^-]$ above 60mmol/L is classified as abnormal and values of $[\text{Cl}^-]$ between 40 and 60mmol/L are considered borderline.

Fecal Elastase Test

Stool samples were analyzed for FEE with the use of a human monoclonal ELISA test (Pancreatic Stool Elastase Kit, ScheBo Biotech AG, Giessen, Germany). Pancreatic sufficiency (PS) was established by FEE values (≥ 2) of above 200 $\mu\text{g/g}$ stool, while FEE concentrations ranging between 100 and 200 $\mu\text{g/g}$ were considered moderate PI. A history of malabsorption together with FEE values $<100 \mu\text{g/g}$ determined PI (Borowitz et al., 2004).

Shwachman-Kulczycki scores

SK scores were performed as before (Shwachman & Kulczycki, 1958) in order to evaluate the severity of CF disease, and to provide a perception of the overall clinical status of the patient. The SK score is divided into four domains namely, general activity; physical examination; nutrition; and radiological findings; each having five possible subscores, according to the degree of impairment (**Annex C**). The scores of the four domains are summed to obtain the final score, from which the condition of the patient is categorized as: excellent (86-100), good (71-85), average (56-70), poor (41-55) or severe (≤ 40) (Shwachman & Kulczycki, 1958). The SK score

was calculated by two pediatric clinicians, pulmonologist and gastroenterologist, with expertise in CF.

Pulmonary Function

Different time point measurements (2-4 per individual) of the best annual forced vital capacity (FVC) and best annual forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) were evaluated from individuals >5-6 years of age, and expressed as a percentage of predicted normal values for sex, age, and height.

Presence of lung pathogens was defined by the presence in bronchoalveolar lavage (BAL) / sputum of: *Staphylococcus aureus* (Sa), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), *Burkholderia cepacia* (Bc); *Achromobacter xylosoxidans* (Ax) or *Aspergillus fumigatus* (Af) (see **Appendix A - Table 1**, under column "Pathogens detected").

CFTR Genotyping

To detect CFTR mutations that were not identified by screening the 6 most common CFTR mutations (F508del, G551D, G542X, R1162X, N1303K, R553X) in the region of Campinas (Brazil) (Correia, 2005), an extended CFTR mutation search was done consisting in two-step automatic DNA sequencing of all 27 exons and the respective flanking intronic regions of the CFTR gene. The first step in genotyping included detection of mutations for 15 exons (exons 3, 6a, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17b, 18, 19, 20, 21 and 24), which show a detection frequency of 95.14% (Bonadia, 2011; Felício, 2011). Such test method with a mutation detection rate of 95%, gives us a 90% probability of finding two abnormal alleles, 10% probability of finding one abnormal allele and 0% probability of finding no abnormal alleles (Moskowitz et al., 2001; Strom et al., 2003). To detect CFTR mutations that were not identified by the above described screening method, we performed DNA sequencing of the remaining 12 exons of the CFTR gene for CF patients. The mutations were classified according to the European Consensus (Castellani et al., 2008) as: a) mutations that cause CF disease; b) mutations that result in a CFTR-related disorder; c) mutations with no known clinical consequence; and d) mutations of unproven or uncertain clinical relevance (**Table 3**).

Rectal biopsies procedure

Colon preparation (cleaning) was done by applying an enema of saline solution (0.9% NaCl) or 12% glycerine solution or by oral mannitol. Superficial 5-6 rectal mucosa specimens (3-4 mm in diameter) were obtained with or without sedation (depending on individuals' will or collaboration) by colon forceps (Endoflex® 3.4mm, Voerde, Germany) with visual examination, avoiding the risk of bleeding or of collecting damaged tissue, and immediately stored in ice-cold RPMI1640 with 5% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), as described before (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998; Mall et al., 2000).

Ussing chamber measurements

Rectal biopsy specimens were mounted and analysed in modified micro-Ussing chambers as previously described under open-circuit conditions (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998; Mall et al., 2000). To minimize sample variability, measurements were performed on 2-5 biopsies (**Figure 6**) and data averaged to obtain a single value per individual. Values for the transepithelial voltage (V_{te}) were referred to the serosal surface of the epithelium. Transepithelial resistance (R_{te}) was determined by applying intermittent (1s) current pulses (0.5 μ A). The equivalent short-circuit current (I_{sc}) was calculated according to Ohm's law ($I_{sc} = V_{te} / R_{te}$), after appropriate correction for fluid resistance. Briefly, the luminal and basolateral surfaces of the epithelium were continuously perfused (5 ml/min) with Ringer solution of the following composition (mmol/l): NaCl 145, KH_2PO_4 0.4, K_2HPO_4 1.6, D-glucose 5, $MgCl_2$ 1, Ca-gluconate 1.3, pH 7.40, at 37° C. HCO_3^- free buffer solutions were used to exclude a possible contribution of CFTR-independent electrogenic HCO_3^- secretion, which would be indistinguishable from electrogenic Cl^- secretion and thus may mimic residual Cl^- channel function in CF colonic epithelia (Mall et al., 2004). Tissues were equilibrated in the micro-Ussing chambers for 30 min in perfused Ringer solution before the below experimental protocol (Mall et al., 2004). Values for basal transepithelial resistance (R_{te}) were similar for all groups of patients: $R_{te (Control)} = 18.63 \pm 0.85 \Omega.cm^2$ (n = 18); $R_{te (non-CF)} = 19.12 \pm 0.12 \Omega.cm^2$ (n = 28); $R_{te (Classic CF)} = 19.60 \pm 1.16 \Omega.cm^2$ (n = 55); and $R_{te (Non-Classical CF)} = 21.68 \pm 2.80 \Omega.cm^2$ (n=12). Amiloride (Amil, 20 μ M, luminal) was added to block electrogenic sodium (Na^+) absorption through the epithelial Na^+ channel (ENaC) and Indomethacin (Indo, 10 μ M, basolateral) was applied for 40-60 min to inhibit endogenous cAMP formation through prostaglandins (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998; Mall et al., 2000, 2004; Mall et al., 2004). As before (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1999, 2004), Na^+ absorption was

significantly augmented in CF rectal tissues in comparison to control ($p=0.041$) or non-CF ($p=0.014$) rectal tissues: $I_{sc-Amil}$ (Classic CF) = $86.75 \pm 17.03 \mu A/cm^2$; $I_{sc-Amil}$ (Non-Classic CF) = $64.39 \pm 17.79 \mu A/cm^2$; $I_{sc-Amil}$ (Control) = $38.56 \pm 5.90 \mu A/cm^2$; and $I_{sc-Amil}$ (Non-CF) = $37.63 \pm 6.34 \mu A/cm^2$. As reported (Mall et al., 1998; Mall et al., 2000) cAMP-dependent and cholinergic Cl^- secretion in human rectal tissues relies on functional CFTR. Thus, we used 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 100 μM , basolateral) and forskolin (2 μM , basolateral) to activate cAMP-dependent Cl^- secretion and carbachol (CCH, 100 μM , basolateral) for cholinergic co-activation (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998; Mall et al., 2000). Thus, percentage of CFTR function was calculated for maximal CFTR activation ($\Delta I_{sc-IBMX/Fsk} + \Delta I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}$) and normalized to the correspondent mean value ($-217.45 \mu A/cm^2$) for the reference non-CF control group.

Histology Preparations

One out of the 4-6 rectal specimens collected per individual was fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin and cut in thin sections (2-3 μM) for histological observation to exclude inflammation, haemorrhage, infection or other tissue damage (**Figure 1**), and data were obtained for 78 individuals.

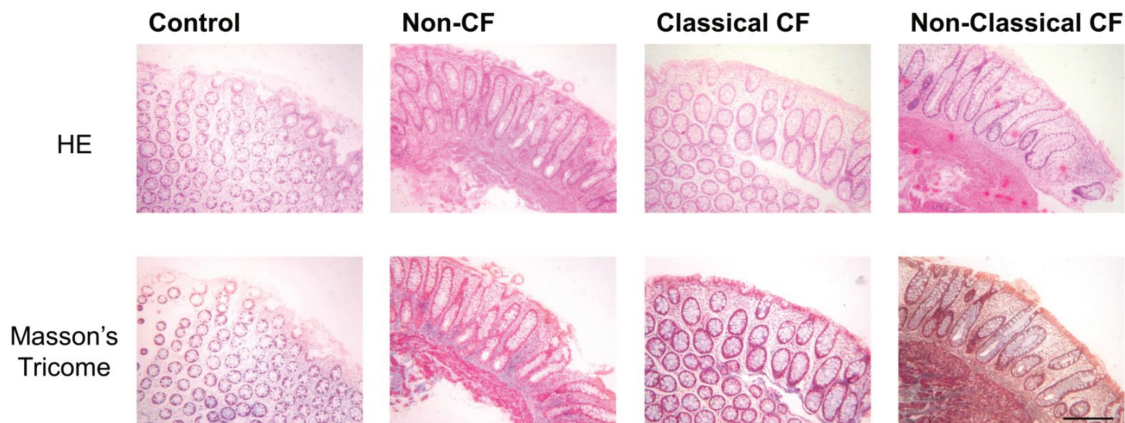


Figure 1: Histological evaluation of rectal biopsies by Hematoxylin-Eosin (HE) and Masson's Tricome stainings. Control (transversal cut), Non-CF (longitudinal cut), Classical CF (transversal cut) and Non-Classical CF (longitudinal cut) biopsies showing a healthy epithelia, namely no fibrotic processes were observed and some biopsies presented inflammatory processes, independent of being CF or not. In HE stained sections we observe nuclei in blue and cytoplasm in pink to red. For Tricome's Masson we observe collagen in blue, nuclei black, and muscle and cytoplasm in red. Black scale bar represents 250 μM .

Sections were then deparaffinized and dehydrated in xylene (twice, 10 min), re-hydrated with absolute ethanol (twice, 5 min), 95% ethanol (2 min), 70% ethanol (2 min) and briefly rinsed with distilled water and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Tricome's Masson as previously (Mall et al. 2004a). Slides were mounted with xylene-based mounting medium.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SPSS software (v. 19; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and a p -value < 0.05 was accepted to indicate statistical difference. Unless otherwise stated, data are shown as mean + SEM (n = number of individuals/specimens studied).

Pearson coefficients (r) were used to find correlations and partial correlations between clinical outcomes and CFTR function. As previously described (Cleveland, Zurakowski, Slaterry, & Colin, 2009; Schaedel et al., 2002), a mixed model regression analysis was chosen to determine the rate of decline in FEV_1 vs. Age among the established groups; and Kruskal-Wallis test for independent samples was used to find differences between the distribution of FEV_1 vs. Age across those groups. For Crosstabs, Pearson Chi-Square Tests were used to determine independence between the variables analysed. Monte Carlo estimates of the exact p -value are provided whenever the data are too sparse or unbalanced for the asymptotic results to be reliable.

A stepwise Discriminant Analysis with Wilks' Λ method was used to identify which variable or variables in study are able to discriminate with highest accuracy the established groups in this study (**Tables 1 and 2**). The assumptions of normality and homogeneity of variance-covariance matrices of each group were tested with Shapiro-Wilk (since one of the groups was small) and Box M tests, respectively. A Classification Analysis was also performed to obtain Fisher's linear classification functions that could predict in which group new cases would be classified.

Table 1: Discriminant Functions: Eigenvalues and Wilk's Lambda statistics.

Eigenvalues					Wilks' Lambda				
Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation	Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	7,238 ^a	90,4	90,4	,937	1 through 2	,069	157,928	6	,000
2	,765 ^a	9,6	100,0	,658	2	,567	33,513	2	,000

a. First 2 canonical discriminant functions were used in the analysis.

NOTE: Eigenvalues show that the biggest proportion (90.4%) of variances (in terms of differences between groups) can be explained by first discriminant function (in this case CCH-induced I_{sc} (following IBMX/Fsk application). Wilks' Lambda (Λ) test of functions shows that both discriminant functions are significant in determining these differences between groups.

Table 2: Canonical Discriminant Functions used in the Analysis.

Structure Matrix			Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients			Functions at Group Centroids		
	Function			Function		CF Clinical Diagnosis - Consensus Guidelines	Function	
	1	2		1	2		1	2
CCH-induced I_{sc} ($\mu A/cm^2$) (following IBMX/Fsk application)	,777 [*]	,290	Sweat Chloride (mmol/L)	,322	,585	Classic CF	1,943	-,284
IBMX/Fsk-induced I_{sc} ($\mu A/cm^2$) ^a	,545 [*]	,076	Fecal Elastase E1 ($\mu g/g$)	-,520	,821	Non-Classic CF	-,861	1,945
Fecal Elastase E1 ($\mu g/g$)	-,658	,705 [*]	CCH-induced I_{sc} ($\mu A/cm^2$) (following IBMX/Fsk application)	,675	,383	Non-CF	-4,347	-,578
Sweat Chloride (mmol/L)	,414	,531 [*]						
Schwachman & Kulczycki Score ^a	,055	-,290 [*]						
FEV1 (% predicted) ^a	-,196	-,265 [*]						
Body Mass Index ^a	,072	-,144 [*]						

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions
Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function
a. This variable not used in the analysis.

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

NOTE: Structural coefficients matrix, showed on the left, explains that CCH-induced I_{sc} (following IBMX/Fsk application) is related to the first discriminant function, while Fecal Elastase E1 and Sweat Chloride values are correlated with the second discriminant function. Standardized coefficients, in the middle panel, also show the same: CCH-induced I_{sc} (following IBMX/Fsk application) is saturated for the first function, whereas both Fecal Elastase E1 and Sweat Chloride concentrations saturated in the second one. Panel on the right shows discriminant functions at group centroids.

Chemicals and Compounds

All chemicals (highest available purity) were from Sigma-Aldrich® (St Louis, MI, USA) or Merck® (Darmstadt, Germany) except for culture media (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Fecal Elastase E1 test was from Schebo ® Biotech AG (Giessen, Germany).

3.1.4 Results

Subjects under study and overview of clinical data

The clinical diagnosis of CF was established based on consensus clinical criteria (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008), namely: 1) presence of one or more characteristic phenotypic features (chronic sinopulmonary disease; gastrointestinal/ nutritional abnormalities; obstructive azoospermia or salt-loss syndrome) and 2) evidence of a CFTR abnormality (increased sweat $[Cl^-]$ (>60 mEq/L) and/or detection of two CF-disease causing mutations). Using these criteria and the current CF classification terminology (De Boeck et al., 2006), two different sub-groups of CF patients ($n = 51$) were established (detailed clinical data in section **Appendix A: Table I-A**): (a) Classic CF patients ($n = 46$) presenting a severe phenotype and classic disease manifestations (high sweat- Cl^- ; PI; nutrition deficiencies; chronic sinopulmonary disease); and (b) Non-Classic CF patients ($n = 5$) with an atypical phenotype or milder disease (pancreatic sufficiency-PS; adulthood diagnosis; less serious lung involvement; and at least one organ with CF phenotype).

A third group included individuals with a clinical suspicion of CF ($n = 49$) of which 27% had only one abnormal sweat- Cl^- value; others presented borderline (22%) or normal (20%) sweat- Cl^- values; and 31% had not been tested for sweat- Cl^- at the time. Most of these individuals (69%) had inconclusive genetic testing (20% had only one CF-disease causing mutation identified) and the remainder had not been CFTR-genotyped at the time (**Appendix A: Table I-B**). Most of them (68%) showed mono-symptomatic features, including: respiratory symptoms in 29% (nasal polyps, chronic cough/bronchitis, pneumonia, bronchiectasis or pansinusopathy); 35% had abnormal gastrointestinal signs (nutrients malabsorption; failure to thrive; hepatobiliary disease; chronic diarrhoea; recurrent pancreatitis; diabetes and glucose intolerance); others presented osteopenia/osteoporosis, liver disease or male infertility. Fourteen percent of these "CF suspicion" individuals presented relatively mild lung disease and nutrition abnormalities, one presenting glucose intolerance and another azoospermia. A group of 9 patients with severe phenotype (both respiratory and gastrointestinal) were initially included in this CF suspicion

group (18%) due to their recent identification and while waiting for confirmation of a CF diagnosis (**Appendix A: Table I-B**).

Assessment of CFTR-mediated Cl^- secretion in rectal biopsies

CFTR-mediated Cl^- secretion was assessed in rectal biopsies from the above two sub-groups of CF patients (Classic and Non-Classic CF) as CF reference. As non-CF control group, we also analysed CFTR function in age-matched individuals undergoing routine colonoscopy for non-CF related reasons. Finally, measurements were carried out in the CF suspicion individuals to establish/exclude a CF diagnosis, following comparison with values from the CF patients and control groups.

As shown previously (Mall et al., 2004a; Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998b; Mall et al., 2000), application of CCH under basal conditions elicited lumen-positive responses in CF and lumen-negative in non-CF tissues (**Figure 2-A, B and C**). Nevertheless, due to variable levels of endogenous prostaglandins, lumen-positive responses can also be observed in non-CF control tissues (Mall et al., 2004a; Mall et al., 2000). Thus, when CCH was applied for a second time, now under indomethacin to completely inhibit endogenous cAMP (and thus CFTR-mediated Cl^- secretion), all tissues presented lumen-positive responses correspondent to potassium (K^+) exiting the cell (**Figure 2-A, B and C**) (Mall et al., 2004a; Mall et al., 2000). Next, when we used IBMX and forskolin (Fsk) to activate cAMP-dependent CFTR-mediated Cl^- secretion (Mall et al. 2004a; Hirtz et al. 2004) ($I_{\text{sc-IBMX/Fsk}}$), we observed lumen-negative responses in tissues from individuals in both the "non-CF control" group (**Figure 2-A**) and "Non-Classic CF" sub-group (**Figure 2-B**) but lumen-positive responses for those in the "Classic CF" sub-group (**Figure 2-C**).

Finally, and as previously described (Mall et al., 2004a; Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998b; Mall et al., 2000; Mall et al., 1998a), following stimulation with CCH in the presence of IBMX/Fsk ($I_{\text{sc-CCH(IBMX/Fsk)}}$), three different response patterns were observed: (i) monophasic lumen-negative (Cl^- -secretory) in tissues from "non-CF controls", and we quantified such negative peak (**Figure 2-A**); (ii) monophasic lumen-positive (K^+ -secretory) in tissues from the "Classic CF" subgroup, and we determined both peak and plateau (**Figure 2-C**); and finally (iii) biphasic responses, in the "Non-Classic CF" sub-group, and we determined both positive and negative peaks (**Figure 2-B**).

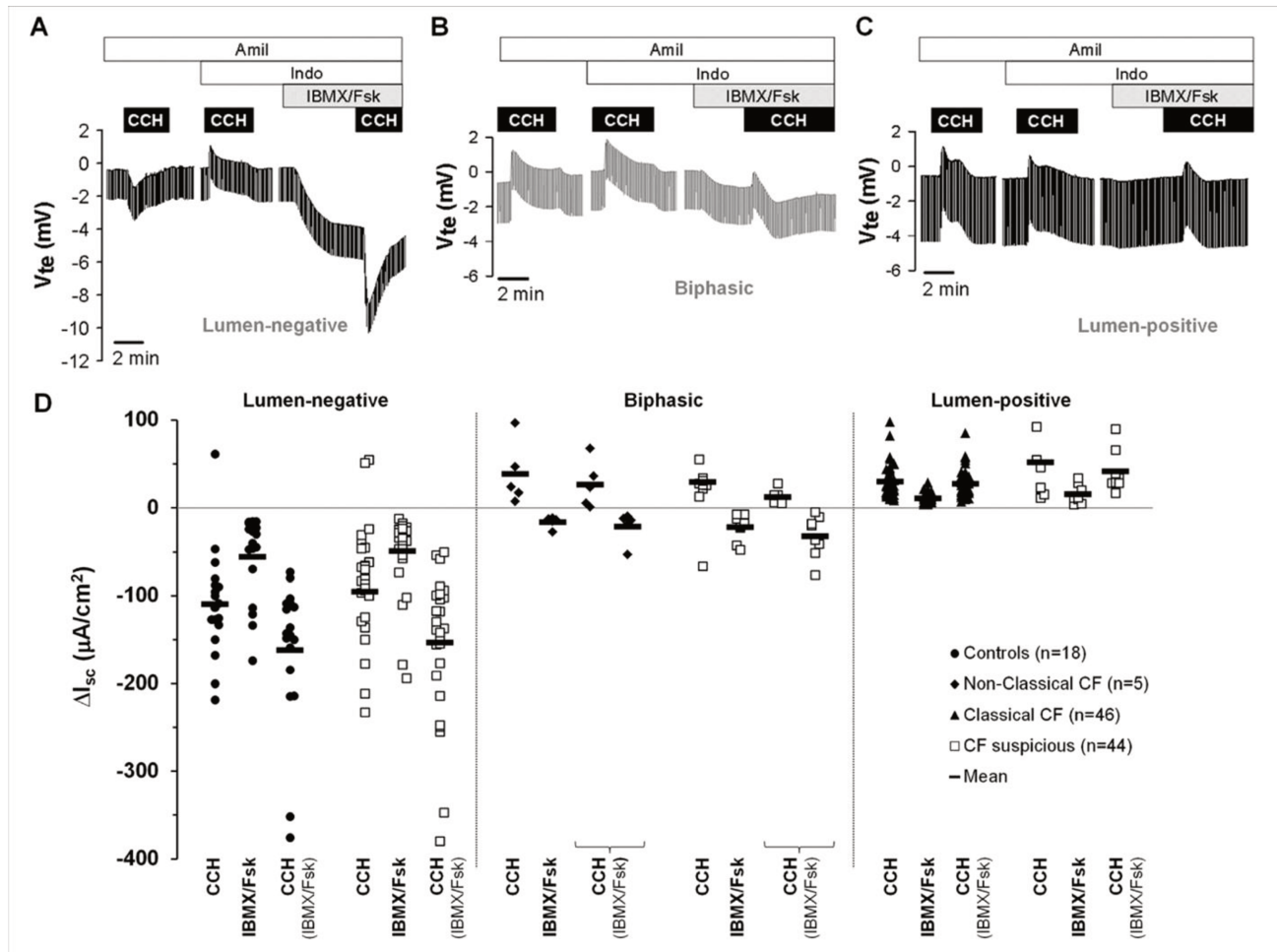


Figure 2 - Results from Ussing chamber measurements in rectal biopsies from 113 individuals. Original recordings of the effects of cholinergic (CCH, 100 μ M) and cAMP-dependent (IBMX, 100 μ M and Fsk, 2 μ M, basolateral) activation on transepithelial voltage in rectal tissues from (A) a healthy control presenting CCH lumen-negative responses; (B) a Non-Classic CF patient showing biphasic responses, thus presenting residual CFTR function; and (C) a Classic CF patient with no detectable Cl⁻ secretion, presenting only lumen-positive responses. All the experiments were performed in the presence of Amiloride (Amil, 20 μ M, luminal) and Indomethacin (Indo, 10 μ M, basolateral). (D) Summary of activated short-circuit currents (ΔI_{sc}) for basal CCH (I_{sc-CCH}), IBMX/Fsk ($I_{sc-IBMX/Fsk}$) and CCH following IBMX/Fsk application ($I_{sc-CCH(IBM/Fsk)}$) in rectal biopsies from controls (lumen-negative, filled circles, n=18), Non-Classic CF (biphasic, filled diamonds, n=5), Classic CF (lumen positive, filled triangles, n=46) and CF suspicious patients (open squares, n=44) showing lumen-negative, biphasic and lumen-positive responses. Data represent the mean of the mean measurements on 2-5 rectal biopsies per individual. Black solid line shows mean ΔI_{sc} values for each group represented in $\mu A/cm^2$: Controls ($I_{sc-CCH} = -109.28 \pm 14.47$; $I_{sc-IBMX/Fsk} = -55.38 \pm 11.12$; $I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = -162.07 \pm 19.64$); Non-Classic CF ($I_{sc-CCH} = 47.20 \pm 17.86$; $I_{sc-IBMX/Fsk} = -16.27 \pm 2.83$; $I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = -21.64 \pm 8.01$); Classic CF ($I_{sc-CCH} = 30.13 \pm 2.66$; $I_{sc-IBMX/Fsk} = 11.30 \pm 0.78$; $I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = 27.17 \pm 2.22$); and CF suspicious with similar ΔI_{sc} distribution.

Confirmation / Exclusion of a CF diagnosis and correlation with genotypes

The equivalent evoked-short-circuit currents (ΔI_{sc}) calculated for individuals in the "CF suspicion" group (**Figure 2-D**, open squares, ΔI_{sc} values in **Appendix – Table I-B**) were compared with the reference values for the CF ("Classic CF" and "non-Classic CF" sub-groups, **Figure 2-D**, black triangles and diamonds, respectively) and control groups (**Figure 2-D**, black circles). Accordingly, each individual with a clinical suspicion of CF could be associated with one of these two groups ($n = 44$): for those with a lumen-negative response (**Figure 2-A and D**) a CF diagnosis was excluded and those presenting only lumen-positive or biphasic responses (**Figure 2-B, C and D**) were considered as CF. For the remainder five, data were inconclusive due to inviability of biopsies. Extended genotyping was performed for all CF-suspicious individuals and two CF-disease causing mutations were eventually detected in individuals with absence or residual CFTR-mediated Cl^- secretion.

One "CF suspicion" patient with severe CF symptoms and the F508del/S549R genotype, evidenced very low levels of CFTR function ($\sim 5\%$ normalized to controls) thus setting the threshold for severe disease at this value. In contrast, among the individuals in the "CF suspicion" group who showed lumen-negative responses, i.e., CFTR function ($Non-CF(I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}) = -153.38 \pm 15.33 \mu A/cm^2$) in the same range as the non-CF control group ($Controls(I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}) = -162.07 \pm 19.64 \mu A/cm^2$) we could only detect one CF-disease causing mutation in one individual (F508del) and two other mutations (4428insGA and D1152H) in two other individuals heterozygous for W1282X and F508del, respectively (see **Table 3** and **Appendix A: Table I-B**). These individuals were later classified as CFTR-RD and 4428insGA and D1152H as CFTR-RD mutations.

Overall, based on the combined data, i.e., CFTR-mediated Cl^- secretion in the colon and *CFTR* genotypes, we could classify the individuals in the "CF suspicion" group ($n = 49$) as: Classic CF ($n = 9$), Non-Classic CF ($n = 7$), CFTR-RD ($n = 2$) and Non-CF ($n = 26$). As to the 5 individuals showing inconclusive Ussing chamber measurements, one individual had one CF-disease causing mutation (G542X) and two individuals had RD-related mutations (V562I and G576A). As we could not confirm/exclude CF in these 5 individuals, they were not included in the hereunder correlations.

Functional classification of rarer mutations also results from these analyses, namely (**Table 3** and **Appendix A: Table I**): 3120+1G>A as class I (2 siblings with 3120+1G>A/R1066C, absence of CFTR-function and severe phenotypes); 1716+18672A>G as

class V (2 other siblings with F508del/1716+18672A>G, residual CFTR function -28-34%- and mild CF); I618T as class IV (in a patient with G542X/I618T, 37% CFTR function and mild disease); and L206W as class IV or CFTR-RD mutation (in a patient with F508del/L206W and the highest CFTR function -57%- and very mild disease).

Table 3: CFTR mutations found in individuals under study. Gene and protein localization, mutation classification and frequency from the present study are designated. Traditional and HGVS standard nomenclature^a for CFTR mutations are also indicated.

Traditional Nomenclature	HGVS Nomenclature ^a		Localization (CFTR gene) ^d	Consequence	Protein localiz.	Freq. (%)	Mutation Classific.	Predicted Functional Class
	cDNA name	Protein name						
F508del	c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	Exon 10	Point deletion	NBD1	63.89	A	II
G542X	c.1624G>T	p.Gly542X	Exon 11	Nonsense	NBD1	7.64	A	I
R1162X	c.3484C>T	p.Arg1162X	Exon 19	Nonsense	ICL4	2.08	A	I
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp	Exon 7	Missense	TM6	2.08	A	IV
3120+1G>A	c.2988+1G>A	-	IVS16	Splicing	-	2.08	A	I
W1282X	c.3846G>A	p.Trp1282X	Exon 20	Nonsense	NBD2	1.39	A	I
P205S	c.613C>T	p.Pro205Ser	Exon 6a	Missense	TM3	1.39	A	IV
1716+18672A>G	c.1584+18672A>G ^b	-	IVS 10	Splicing ^c	-	1.39	A	V
1717-1G>A	c.1585-1G>A	-	IVS11	Splicing	-	1.39	A	I
1812-1G>A	c.1680-1G>A	-	IVS12	Splicing	-	1.39	A	I
2183AA>G	c.2051_2052delAA insG	p.Lys684Ser fsX38	Exon 13	Frameshift	RD	1.39	A	I
A561E	c.1682C>A	p.Ala561Glu	Exon 12	Missense	NBD1	1.39	A	II
3272-26A>G	c.3140-26A>G	-	IVS17b	Splicing	-	0.69	A	V
G85E	c.254G>A	p.Gly85Glu	Exon 3	Missense	TM1	0.69	A	II
I618T	c.1853T>C	p.Ile618Thr	Exon 13	Missense	NBD1/ RD	0.69	A	IV
N1303K	c.3909C>G	p.Asn1303Lys	Exon 21	Missense	NBD2	0.69	A	II
R1066C	c.3196C>T	p.Arg1066Cys	Exon 17b	Missense	ICL4	2.08	A	II
R553X	c.1657C>T	p.Arg553X	Exon 11	Nonsense	NBD1	0.69	A	I
S549R(T>G)	c.1647T>G	p.Ser549Arg	Exon 11	Missense	NBD1	0.69	A	III
S4X	c.11C>A	p.Ser4X	Exon 1	Nonsense	N-terminus	0.69	A	I
V562I	c.1684G>A	p.Val562Ile	Exon 12	Missense	NBD1	0.69	B	

L206W	c. 617T>G	p.Leu206Trp	Exon 6a	Missense	TM3	0.69	A / B	IV
4428insGA	c.4296_4297insGA	p.Ser1435GlyfsX14	Exon 24	Frameshift	C-terminus	0.69	B	VI
D1152H	c.3454G>C	p.Asp1152His	Exon 18	Missense	TM12/NBD2	0.69	B / A	IV
G576A	c.1727G>C	p.Gly576Ala	Exon 12	Missense/Splic	NBD1	0.69	B / A	V
IVS8-5T	-	-	Exon 9	Exon 9 skiping	-	2.78	B / C	

NOTE: A - CF-causing mutation; B - CFTR-RD mutation; C - Mutation with no clinical consequence.

^a Reference CFTR sequence accession number: NM_000492.3, nucleotide number 1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon, in the reference sequence is numbered as 133.

^b According to the HVGs guidelines this mutation should be named: 1585-9412bp A>G.

^c Inclusion of 104bp cryptic exon between exon 10 and exon 11 in the CFTR transcripts.

^d Traditional Nomenclature

Correlation between CFTR-mediated Cl⁻ secretion and clinical outcomes

In order to assess the value of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in rectal biopsies as a predictive tool for CF, we attempted to statistically correlate these values with the accepted CF-characteristic parameters (**Table 4**), namely: sweat [Cl⁻] (**Figures 3-A and 4-A**); FEE (**Figures 3-B and 4-B**); BMI (**Figure 4-C**); and age at diagnosis (**Figures 3-D and 4-D**). For the correlations involving SK scores (**Figures 3-C and 4-E**) and FEV₁ (**Figures 3-E and 4-F**), we subdivided patients into 4 age-groups (in years): 0-9; 10-19; 20-29; and ≥30, since these parameters have been shown to decline with age (Schaedel et al., 2002).

Table 4: Correlations between clinical outcomes and CFTR-mediated I_{sc} in rectal biopsies.

	Assessment of CFTR Function in Rectal Biopsies			
	I _{sc} -IBMX/Fsk		I _{sc} -CCH (IBMX/Fsk)	
	Pearson (<i>r</i>)	p-value	Pearson (<i>r</i>)	p-value
Sweat Chloride	+0.495	3.41 x 10⁻⁷	+0.677	4.73 x 10⁻¹⁴
Fecal Elastase E1	-0.721	6.83 x 10⁻¹⁴	-0.770	1.10 x 10⁻¹⁶
Age at Diagnosis	-0.728	1.34 x 10⁻¹²	-0.713	6.18 x 10⁻¹²
BMI	-0.169	0.101	-0.226	0.028
BMI <i>Age at study</i>	-0.104	0.319	-0.121	0.244
SK Score	-0.274	0.009	-0.362	4.59 x 10⁻⁴
SK Score <i>Age at study</i>	-0.302	0.004	-0.411	6.44 x 10⁻⁵
FEV₁	-0.205	0.071	-0.240	0.035
FEV₁ <i>Age at study</i>	-0.251	0.028	-0.301	0.008

NOTE: Pearson coefficients (*r*) and p-values showing statistical correlations (*p* < 0.05) are highlighted (n=95).

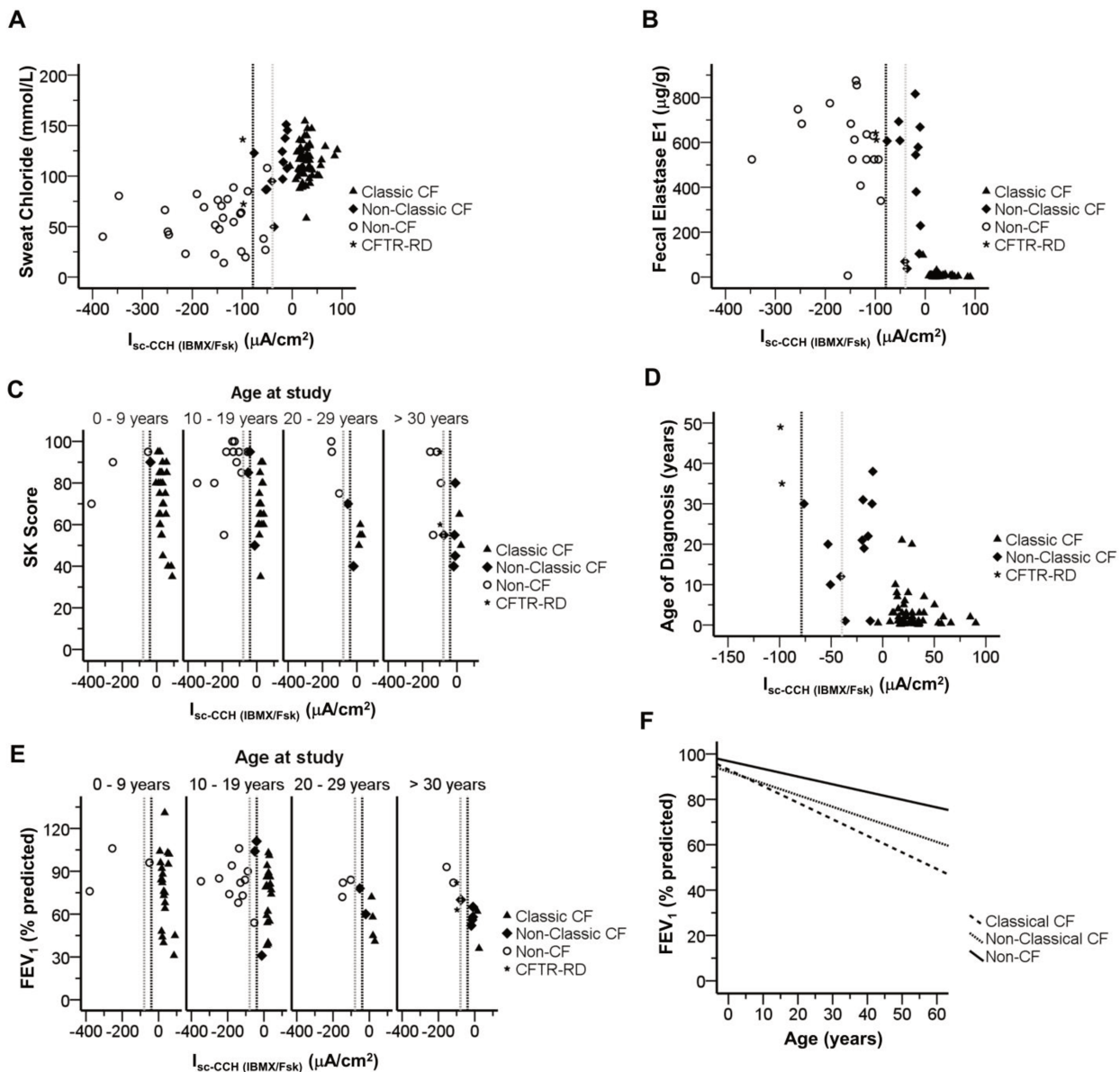


Figure 3: Correlations between CF clinical features and CCH-induced short circuit currents following IBMX/Fsk application ($I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}$). Scatter-plot summarizing the distribution of $I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}$ against (A) sweat $[Cl^-]$ (mmol/L); (B) FEE concentrations ($\mu g/g$ of stools); (C) SK clinical scores distributed by groups of ages; (D) age at diagnosis (in years); and (E) FEV₁ distributed by groups of ages, for the individuals included in the study showing conclusive results ($n=113$) and classified according to CF Clinical Diagnosis Consensus Guidelines as: Classic CF (filled triangles, $n=55$); Non-Classic CF (filled diamonds, $n=12$); CFTR-RD (star, $n=2$); and non-CF (open circles, $n=26$). Vertical dashed black line represents subtraction of one STD of the mean value calculated for $I_{sc-CCH} (IBMX/Fsk)$ ($\Delta I_{sc} = -78.77 \mu A/cm^2$) in non-CF controls (“grey zone”). Vertical dotted grey line represents addition of one STD of the mean value calculated for $I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)}$ ($\Delta I_{sc} = -39.55 \mu A/cm^2$) in reference sub-group of Non-Classic CF patients. (F) Mixed regression model for decline rates in FEV₁ vs. Age ($n=232$ measurements) for Classic CF ($y=93.15-0.73x$), Non-Classic CF ($y=92.23-0.52x$), and Non-CF ($y=96.86-0.34x$) groups.

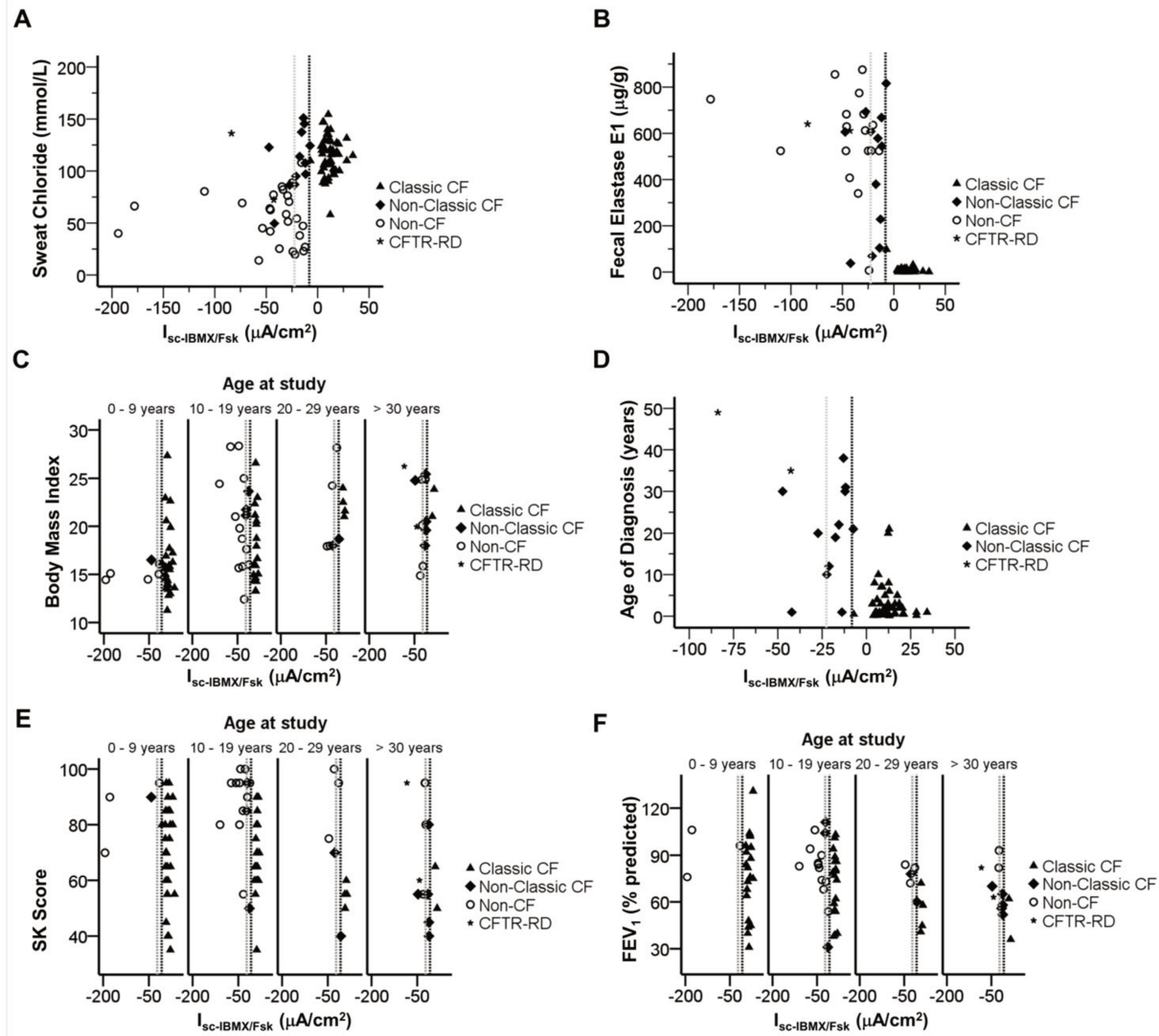


Figure 4: Correlations between CF clinical features and IBMX/Fsk-induced short circuit currents ($I_{sc-IBMX/Fsk}$). Scatter-plot summarizing the distribution $I_{sc-IBMX/Fsk}$ against (A) sweat $[Cl^-]$ (mmol/L); (B) FEE concentrations ($\mu g/g$ of stools); (C) BMI distributed by groups of ages; (D) age at diagnosis (in years); (E) SK clinical scores distributed by groups of ages; and (F) FEV₁ distributed by groups of ages, for the individuals included in the study showing conclusive results ($n=113$) and classified according to CF Clinical Diagnosis Consensus Guidelines as: Classic CF (filled triangles, $n=55$); Non-Classical CF (filled diamonds, $n=12$); CFTR-RD (star, $n=2$); and non-CF (open circles, $n=26$). Vertical dashed black line represents subtraction of one standard deviation (STD) of the mean value calculated for $I_{sc-IBMX/Fsk}$ in non-CF controls ($\Delta I_{sc} = -8.18 \mu A/cm^2$). Vertical dashed grey line represents addition of one STD of the mean value calculated for $I_{sc-IBMX/Fsk}$ in reference sub-group of Non-Classical CF patients ($\Delta I_{sc} = -22.60 \mu A/cm^2$).

Our data (Figures 3 and 4 and Table 4) show high correlations between CFTR-mediated Cl^- secretion values and these parameters describing CF phenotypes. Indeed, patients with absence/very low CFTR-mediated Cl^- secretion ($\leq 5\%$) had higher sweat- Cl^- values (114.23 ± 2.33

mmol/l), lower FEE concentrations ($9.08 \pm 2.04 \mu\text{g/g}$), earlier age at diagnosis (2.7 ± 0.6 yrs), lower SK scores (by aged-grouped: $\text{mean}_1 = 71 \pm 3$, $\text{mean}_2 = 69 \pm 3$; $\text{mean}_3 = 56 \pm 2$; $\text{mean}_4 = 58 \pm 8$), and lower FEV₁ (by aged-grouped: $\text{mean}_1 = 77 \pm 6$; $\text{mean}_2 = 72 \pm 5$; $\text{mean}_3 = 55 \pm 5$; $\text{mean}_4 = 49 \pm 13$) than individuals with normal values of CFTR-mediated Cl⁻ secretion (**Table 5**). Moreover, CF patients with residual values of CFTR-mediated Cl⁻ secretion had intermediate values in those parameters, namely: sweat-Cl⁻ values (109.80 ± 8.34 mmol/l); FEE concentrations ($444.57 \pm 78.05 \mu\text{g/g}$), age at diagnosis (19.6 ± 3.4 yrs), SK scores (by aged-grouped: $\text{mean}_1 = 90$; $\text{mean}_2 = 77 \pm 14$; $\text{mean}_3 = 63 \pm 12$; $\text{mean}_4 = 55 \pm 7$); and FEV₁ (by aged-grouped: $\text{mean}_1 = \text{n.a.}$; $\text{mean}_2 = 82 \pm 26$; $\text{mean}_3 = 61 \pm 9$; $\text{mean}_4 = 60 \pm 3$) (**Table 5**). Moreover, patients with classic CF and $\leq 5\%$ CFTR-mediated Cl⁻ secretion consistently presented faster decline rates of pulmonary function (Cleveland et al., 2009; Schaedel et al., 2002) (**Fig. 3-F, dashed line**), than Non-Classic CF patients retaining residual (**Fig. 3-F, dotted line**) or normal CFTR functions (**Fig. 3-F, solid line**, $p=0.001$ by Kruskal-Wallis test). Regarding BMI, only a modest trend was observed for lower BMI values in CF patients with absence of Cl⁻ secretion, not related to age differences (**Figure 4-C and Table 4**).

Next, we analysed the distribution of other clinical features (MI, nasal polyposis, diabetes/glucose intolerance, osteopenia/osteoporosis) and also presence of lung pathogens in the three groups under study. Significant differences (**Table 6**) were found between the groups under study for the distribution of lung pathogens ($p = 1.75 \times 10^{-6}$, 88% of CF patients with pathogens), with predominance of Pa, and MI ($p = 0.0015$, 24% of CF patients with MI). Altogether, these data indicate that our approach to measure the level of CFTR (dys)function in rectal biopsies provides data evidencing good correlation with the CF severity.

Table 5: Mean and standard error of the mean values for clinical parameters among the 3 groups of individuals analyzed in this study: Classic CF; Non-Classic CF and Non-CF.

	CF Clinical Diagnosis											
	Classic CF (I _{sc} -CCH(IBMx/Fsk) = 28.68±2.22 μA/cm ² ; n=55)				Non-Classic CF (I _{sc} -CCH(IBMx/Fsk) = -30.06±6.15 μA/cm ² ; n=12)				Non-CF (I _{sc} -CCH(IBMx/Fsk) = -153.38±15.33 μA/cm ² ; n=28)			
Sweat Cl ⁻ (mmol/l)	114.23 ± 2.33				109.80 ± 8.34				58.84 ± 5.38			
FE E1 (μg/g)	9.08 ± 2.04				444.57 ± 78.05				585.44 ± 44.99			
BMI	17.37 ± 0.52				21.15 ± 0.92				19.76 ± 0.92			
Age at diagnosis (yrs)	2.7 ± 0.6				19.6 ± 3.4				-			
Aged-grouped	0-9 yrs	10-19 yrs	20-29 yrs	≥ 30 yrs	0-9 yrs	10-19 yrs	20-29 yrs	≥ 30 yrs	0-9 yrs	10-19 yrs	20-29 yrs	≥ 30 yrs
FEV1 (% predicted)	77 ± 6	72 ± 5	55 ± 5	49 ± 13	-	82 ± 26	61 ± 9	60 ± 3	93 ± 9	81 ± 4	79 ± 4	80 ± 6
FVC (% predicted)	85 ± 6	79 ± 5	71 ± 8	69 ± 22	-	83 ± 17	69 ± 15	74 ± 4	108 ± 11	88 ± 4	83 ± 7	84 ± 8
SK score	71 ± 3	69 ± 3	56 ± 2	58 ± 8	90	77 ± 14	63 ± 12	55 ± 7	85 ± 8	88 ± 4	90 ± 8	80 ± 8

Table 6: Distribution of clinical features among the 3 groups of individuals analysed here: Classic CF; Non-Classic CF and Non-CF.

		CF Clinical Diagnosis			
		Classic CF ($I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = 28.68 \pm 2.22 \mu A/cm^2$; n=55)	Non Classic CF ($I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = -30.06 \pm 6.15 \mu A/cm^2$; n=12)	Non-CF ($I_{sc-CCH(IBM/Fsk)} = -153.38 \pm 15.33 \mu A/cm^2$; n=28)	Total
Lung Pathogens ($p = 1.75 \times 10^{-6}$)	Pa	7	3	1	11
	Pa + other pathogens	21	5	0	26
	Other pathogens	20	3	2	25
	Negative	2	0	7	9
	n.a.	5	1	18	24
Meconium Ileus ($p = 0.0015$)	Positive	16	0	0	16
	Negative	39	12	26	77
	n.a.	0	0	2	2
Nasal Polyposis ($p = 0.591$)	Positive	10	4	6	20
	Negative	44	8	20	72
	n.a.	1	0	2	3
Glucose Intolerance Diabetes ($p = 0.303$)	Gluc. Intol.	5	1	0	6
	Diabetes	5	2	2	9
	Gluc. Intol. /Diabetes	5	0	0	5
	Negative	39	9	23	71
	n.a.	1	0	3	4
Osteopenia Osteoporosis ($p = 0.511$)	Osteopenia	2	0	2	4
	Osteoporosis	6	3	2	11
	Negative	46	9	22	77
	n.a.	1	0	2	3

NOTE: n.a., Not analysed. p-values showing statistical differences among groups under study ($p < 0.05$) are highlighted (n = 95).

Evaluation of the best tool for discriminating CF patients from Non-CF individuals

Following the above findings, we attempted to establish a CF diagnosis tool which could also serve for disease prognosis. We thus used a stepwise discriminant analysis to evaluate which one(s) among the clinical and laboratory measurements available (sweat-Cl⁻; FEE; BMI; SK score; FEV₁; I_{sc}-IBMX/Fsk; and I_{sc}-CCH(IBM/Fsk)), constitutes the best discriminator factor between patients with Classic and Non-Classic CF and also between these groups and non-CF individuals (see **Methods- Statistical analyses**).

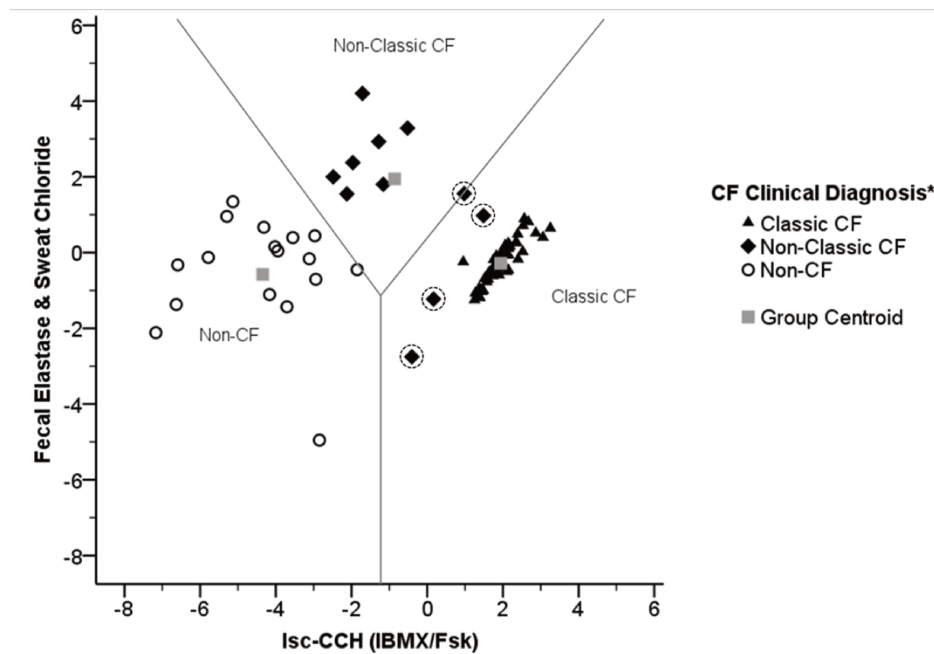


Figure 5: Distribution showing the relative position of each individual in the study according to the scores obtained by discriminant analysis (territorial map). Analysis performed for individuals having complete information about I_{sc}-CCH(IBM/Fsk), FEE concentration in stools and sweat-Cl⁻ (n=75): Classic CF (filled triangles, n=47); Non-Classic CF (filled diamonds, n=11); and non-CF (open circles, n=17). Misclassified cases are marked with dotted circles. Grey squares represent the group centroids and grey lines the barriers between each group. * according to consensus criteria (see text).

As shown in **Figure 5**, discriminant function 1 (x-axis), corresponding to CFTR-mediated Cl⁻ secretion measurements in rectal biopsies under CCH (I_{sc}-CCH(IBM/Fsk)), is the best option to explain the differences between the three groups in 90.4% of cases (**Methods - Tables 1 and 2**). Additionally, FEE concentration and sweat-Cl⁻ correspond to discriminant function 2 (y-axis) enabling separation of an additional ~6% of the remainder individuals (see **Methods - Tables 1 and 2**). Notwithstanding, four Non-Classic CF patients were still misclassified as Classic CF (**Figure 5**, black diamonds with dotted circles). Furthermore, to translate this

discriminant analyses into a diagnosis algorithm, we have obtained its respective Fisher's linear classification functions as (see **Methods- Statistical analyses and Table 2**):

$$\text{Classic CF} = 0.317(\text{Sweat Chloride}) + 0.005(\text{Fecal Elastase}) + 0.012(I_{\text{sc-CCH(IBM/Fsk)}}) - 18.909$$

$$\text{Non-Classic CF} = 0.338(\text{Sweat Chloride}) + 0.028(\text{Fecal Elastase}) - 0.015(I_{\text{sc-CCH(IBM/Fsk)}}) - 28.485$$

$$\text{Non-CF} = 0.202(\text{Sweat Chloride}) + 0.026(\text{Fecal Elastase}) - 0.102(I_{\text{sc-CCH(IBM/Fsk)}}) - 23.414$$

These allow classification of a new CF suspicion case by replacing in these 3 equations the values from laboratory measurements obtained for a given individual. The function giving the highest value will correspond to the CF classification group best describing the individual.

3.1.5 Discussion

The wide spectrum of CF phenotypes, high variability of CF lung disease, the uncertain (dys)function of many rare CFTR mutations together with increasing numbers of asymptomatic patients identified in recent newborn CF screens, have posed major challenges to clinicians for the establishment of CF diagnosis and prognosis (Farrell et al., 2008; Boyle, 2003; De Boeck et al., 2006). Such hurdles make it difficult for caregivers to provide adequate genetic counseling and medical care, risking worsening of symptoms and organ damage.

Good correlations between CFTR-mediated Cl⁻ secretion and CF parameters

To evaluate the robustness of colonic CFTR-mediated Cl⁻ secretion as a diagnosis/prognosis biomarker and thus help overcoming such difficulties, we assessed CFTR (dys)function *ex vivo* in 524 rectal biopsies from 118 individuals, including the largest cohort of CF patients ever analysed by this approach (n=51), a non-CF (control) group (n=18) and individuals with clinical CF suspicion to confirm/ exclude a CF diagnosis (n=49). The functional data, demonstrating good correlations with most CF-defining parameters, have also provided key information to adjust the clinical judgment of a CF diagnosis and prognosis.

Our approach consists in direct measurements of colonic CFTR function assessed through both cAMP-dependent and cholinergic Cl⁻ secretion which, as previously shown (Mall et al., 1998a; Mall et al., 1998b; Mall et al., 2000), are strictly dependent on the presence of functional

CFTR. Our data here show that CFTR-mediated Cl^- secretion is absent or present at almost undetectable levels (<5%) in 244 biopsies from patients with classic forms of CF (**Figure 2 and Appendix – Table I**), as defined by consensus criteria (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008; De Boeck et al., 2006) including: early age at diagnosis (2.7 ± 0.6 yrs), very high sweat- Cl^- (114.23 ± 2.33 mmol/l) and PI (9.08 ± 2.04 $\mu\text{g/g}$) (**Figures 3 and 4 and Table 5**). This group of Classic CF patients also presented other severe CF symptoms, like MI (29%), associated diabetes and/or glucose intolerance (27%), lung pathogens (87%) and also hepatic involvement (29%) (**Table 6 and Appendix – Table I**). In contrast, a group of patients with milder symptoms, classified as Non-Classic CF by established guidelines (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008; De Boeck et al., 2006), evidenced residual CFTR-mediated Cl^- secretion (10 to 57%), consistently with our previous data (Hirtz et al., 2004). Indeed, most of patients in this group were diagnosed at an older age (19.6 ± 3.4 yrs) and were PS (444.57 ± 78.05 $\mu\text{g/g}$) (**Figures 3 and 4 and Table 5**). Additionally, by stratifying patients into four different age groups, our functional data also showed good correlations with lung function (FEV_1) and SK scores (**Table 4**, $r = -0.301$ and -0.411 , respectively), where patients with highest values evidenced residual colonic CFTR-mediated Cl^- secretion.

Comparison with other bioelectric methods

By applying a different Ussing chamber protocol for bioelectric measurements in rectal biopsies, other authors used an overall parameter resulting from a combination of different readouts, some relying on indirect activation of CFTR and thereof proposed a cut-off value (Derichs et al., 2010). Yet, application of such protocol in another study reported a classic CF patient evidencing readout values higher than the cut-off (van Barneveld et al., 2010). So, it is our conviction that such cut-off value cannot be clearly established for usage among different laboratories (Derichs et al., 2010; van Barneveld et al., 2010). Moreover, several technical aspects differed between the current and such protocol. Firstly, here we use bicarbonate (HCO_3^-)-free buffer solutions to exclude a possible contribution of electrogenic HCO_3^- secretion to lumen-negative $V_{\text{te}}/I_{\text{sc}}$ (Hirtz et al., 2004; Pratha et al., 2000; Mall et al., 2004b). Secondly, our measurements evidence stable baselines in contrast to the drifting baselines reported in those studies where agonist responses have to be determined from estimated baselines (van Barneveld et al., 2010). Thirdly, our readout is based on direct CFTR-mediated Cl^- secretion under complete inhibition of endogenous cAMP (Mall et al., 2004a; Hirtz et al., 2004; Mall et al., 1998b; Mall et

al., 2000; Mall et al., 1998a; Mall et al., 2004b), instead of complex bioelectric responses involving two different Ca^{2+} -dependent agonists and an anion-transporter inhibitor following incomplete prostaglandin inhibition (Derichs et al., 2010; van Barneveld et al., 2006; van Barneveld et al., 2010). Our protocol has the major advantage of using continuous perfusion which allows for pairwise examination of agonists. Altogether, these characteristics, together with the demonstration of its extreme sensitiveness (accurate calculation of CFTR activity down to <5%, see **Appendix – Table I**), and high reproducibility (very stable baseline currents during the >2h course of the experiments and similar recordings in different biopsies from the same individual, **Figure 6**) make the current approach a superior contribution for CF diagnosis and prognosis (**Figure 5**).

Another technique to support a CF diagnosis is NPD measurements. The outcome of this approach, however, relies on a composite score including both ENaC- and CFTR-mediated responses (Knowles et al., 1981; Ho et al., 1997; Walker et al., 1997; Wallace et al., 2003; Standaert et al., 2004; Sermet-Gaudelus et al., 2010), where two abnormal NPD recordings on separate days evidence CFTR dysfunction (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008). The technique, however, has variable applicability for adults and children (Sermet-Gaudelus et al. 2010). Moreover, this *in vivo* procedure requires patient immobilization and sedation (for children <6yrs) for at least ½h (Sermet-Gaudelus et al., 2010), while the rectal biopsing only takes ~10 min allowing for multiple *ex vivo* measurements of different samples from the same individual and lead to conclusive results (96% here) for a highest percentage of individuals than NPD (91% (Sermet-Gaudelus et al., 2010)). Moreover, NPD values considerably overlap among CF patients, carriers and non-CF controls (Sermet-Gaudelus et al., 2010; Ho et al., 1997; Walker et al., 1997; Wallace et al., 2003). This may be due to the fact that NPD is not a truly quantitative measurement but relies on the pure measurement of voltages.

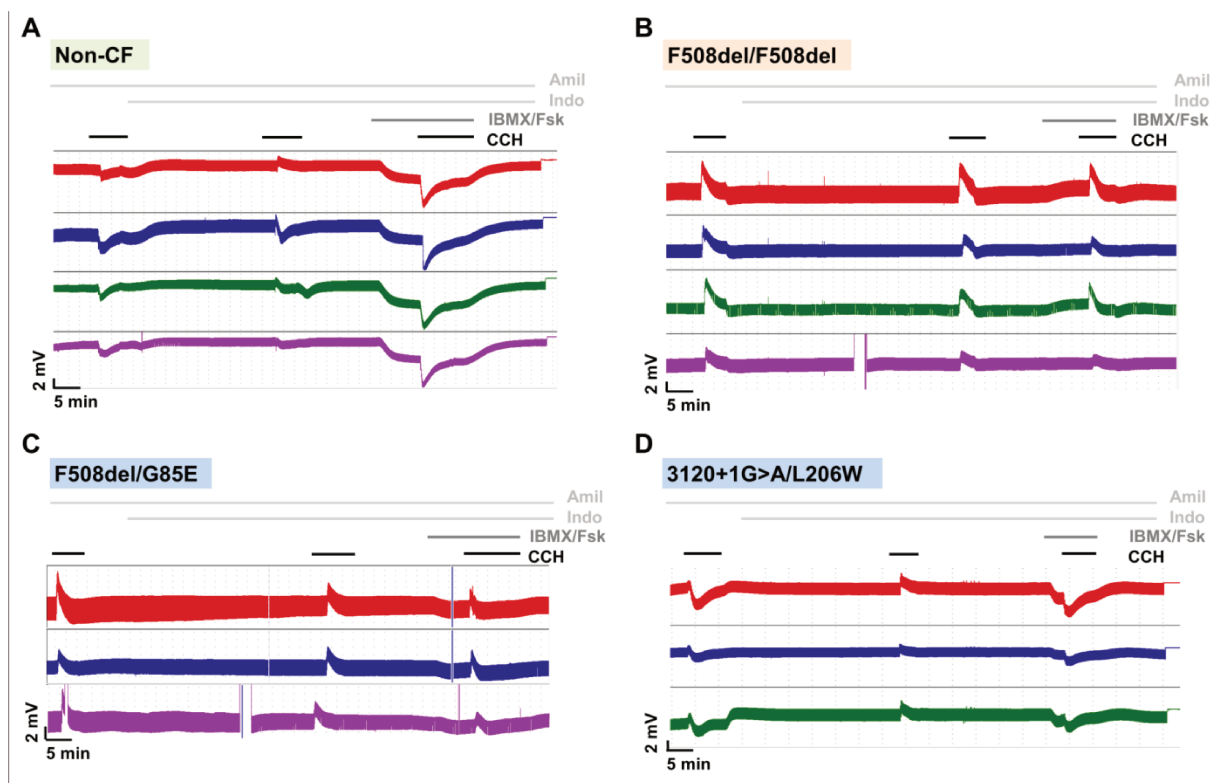


Figure 6: Original recordings of transepithelial voltage (V_{te}) measurements in Ussing chambers obtained in 3-4 rectal biopsies from the same individual evidencing the high reproducibility of the method. Rectal biopsies from (A) Non-CF individual showing large cholinergic (carbachol, CCH, 100 μ M, basolateral) and cAMP-dependent (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, 100 μ M, and forskolin, Fsk, 2 μ M, basolateral) Chloride (Cl^-) secretion (lumen-negative responses); (B) CF patient homozygous for F508del-CFTR mutation with absence of Cl^- secretion (only lumen-positive responses, reflecting potassium (K^+) secretion, were observed); (C) CF patient (genotype: F508del/G85E-CFTR) showing very little (~12%) cAMP-dependent Cl^- secretion (biphasic responses observed upon co-cholinergic stimulation with CCH); and (D) CF patient (genotype: 3120+1G>A/L206W-CFTR) presenting larger CFTR residual function (~57%) and milder phenotype than in (C). All the experiments were performed in the presence of Amiloride (Amil, 20 μ M, luminal) and Indomethacin (Indo, 10 μ M, basolateral). Transepithelial resistance (R_{te}) was determined from V_{te} deflections obtained by pulse current injection (0.5 μ A).

Validation as a biomarker for CF diagnosis / prognosis

Importantly, we show here how assessment of colonic CFTR function was a key tool to exclude CF in 28 individuals (2 of classified as CFTR-RD patients). In fact, despite that the clinical features of these individuals suggested CF, both genotyping and sweat test were inconclusive (**Appendix – Table I-B**). This leads us to conclude of the importance of this approach for patients in the "grey" zone (**Figures 3 and 4**) for the establishment/ exclusion of a final diagnosis of CF or CFTR-RD.

Interestingly, our data are also highly informative to correlate CFTR function with *CFTR* genotypes (**Figure 7**). For instance, we were able to detect very low function (~5% CFTR function vs non-CF controls) in a patient bearing S549R, recently described as Class III (Yu et al., 2012), whereas significant CFTR-mediated Cl⁻ secretion was found in two patients bearing 4428insGA and D1152H (84 and 64%, respectively). Thus, we classify the former here as CF-disease causing and the two latter as CF-RD mutations.

In the present study, we have also used a statistical discriminant analysis to identify which clinical and functional parameter(s) better reflects the differences between Classic CF, Non-Classic CF and Non-CF groups for prognosis. Results show that I_{sc-CCH(IBMx/Fsk)} measurements are more discriminative than I_{sc-IBMx/Fsk}, evidencing the highest discriminant power (90.4%) among the three groups studied. The second and third parameters with higher discriminant power are FEE and sweat-Cl⁻ concentration, respectively. Using such analysis (**Figure 5**), one can for example predict that individuals in the "Non-Classic CF" group with values lying closer to the "Non-CF" cluster, have better prognosis than those with values closer to the "Classic CF" cluster. In fact, the only four cases with "Non-Classic CF" which were misclassified as "Classic CF" by this analysis, correspond to individuals with moderate PI and/or low levels of CFTR function. It may thus be expected that these four patients develop severe CF earlier than most Non-Classic ones. Interestingly, and corroborating such prediction among these four, there is a 19-year old patient with the F508del/G85E genotype, moderate PI (FEE=103.89 µg/g) and ~12% of CFTR function (**Figure 6-C** and **Appendix – Table I**) who recently (last 1½ yr) started to progress from a relatively mild to moderate-severe lung disease, with five pulmonary exacerbations plus surgery to remove nasal polyps associated with a strong sinusitis.

Recently, we demonstrated that the current approach may be used in pre-clinical assessment of therapeutic compounds efficacy directly on native tissues (Roth et al., 2011) and similarly it may be used to identify CF patients (and CFTR mutations) who will respond to innovative therapeutic strategies, namely those aimed at increasing the residual CFTR activity and already approved for clinical use for other mutations towards a predictive personalized-medicine approach (Accurso et al., 2010; Hirtz et al., 2004; Ramsey et al., 2011; Roth et al., 2011; Shah, 2011; Van Goor et al., 2009). For example, the patient with S549R could be tested *ex vivo* for the correction with the FDA-approved potentiator Ivacaftor, as suggested by the *in vitro* data (Yu et al., 2012). Moreover, our data also indicate that this approach, together with sweat-Cl⁻

is probably the best biomarker in clinical trials aimed at modulating CFTR (Accurso et al., 2010; Clancy et al., 2011).

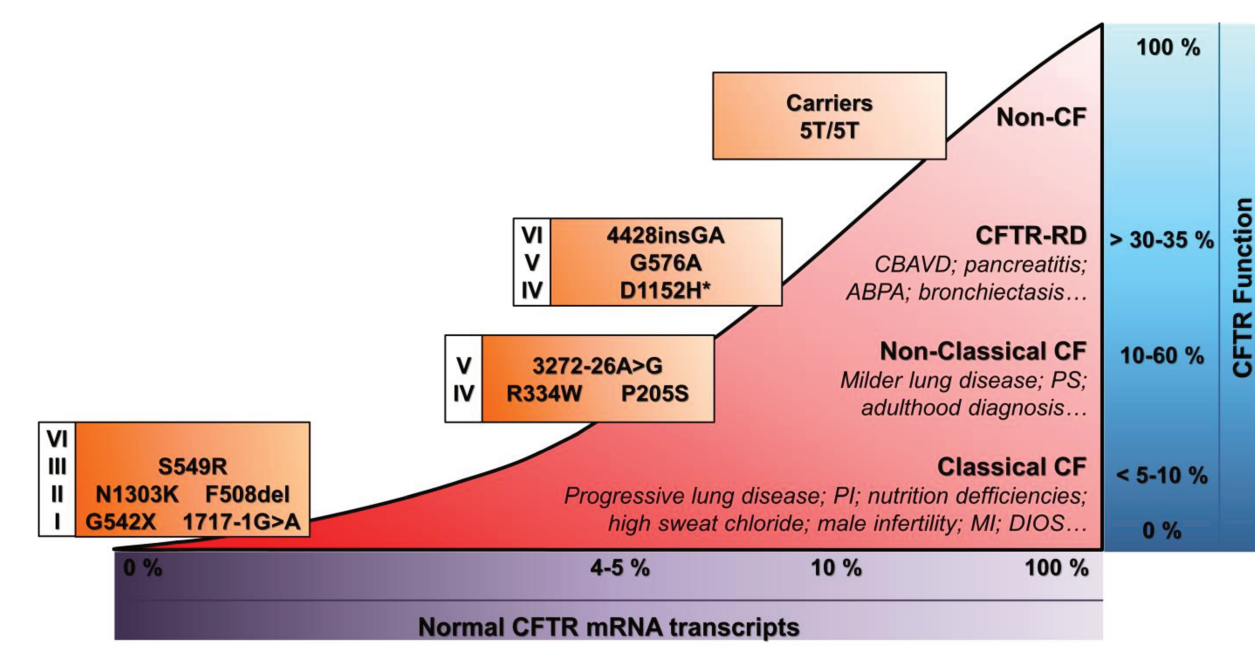


Figure 7: Association of CF clinical phenotypes with the levels of normal CFTR mRNA transcripts, CFTR function (as percentage of maximal CFTR activation normalized to control group) and CFTR mutations (grouped by functional classes of mutations) with examples found in this study. Indicated values are speculative. *D1152H may belong either to CFTR-RD or CFTR-disease causing mutations. CBAVD, Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens; ABPA, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis; PS, Pancreatic Sufficiency; PI, Pancreatic Insufficiency; MI, Meconium Ileus; DIOS, Distal Intestinal Obstruction Syndrome.

What is the functional CFTR threshold to avoid CF?

Finally, in an attempt to further answer the old question "how much functional CFTR would be enough to avoid CF?" (Amaral, 2005) we have put together the current and previous findings including those concerning mRNA levels to identify the threshold for CF (Amaral et al., 2001; Beck et al., 1999; Hirtz et al., 2004; Ramalho et al., 2002) (**Figure 7**). Indeed, we previously showed that ~5% of normal *CFTR transcripts* (relative to non-CF individuals) is sufficient to attenuate CF severity (Amaral et al., 2001; Beck et al., 1999; Ramalho et al., 2002). From our current and previous data, we propose that CFTR values above ~10% of normal CFTR *function* are required for a better CF prognosis. Indeed, CF patients with CFTR function below 10% evidence more severe CF (see **Appendix – Table I**). Moreover, non-CF controls and

individuals for whom a CF diagnosis was discarded show CFTR-mediated Cl⁻ secretion $\geq 30\text{--}35\%$, as before (Hirtz et al., 2004).

Altogether, our current approach to measure CFTR-mediated Cl⁻ secretion in rectal biopsies is demonstrated here to be a sensitive, reproducible and robust predictive biomarker for the diagnosis/prognosis of CF. Moreover this method has very high potential for (pre-)clinical trials of innovative therapeutic approaches involving CFTR-modulators.

3.1.6 References

- Accurso, F. J., Rowe, S. M., Clancy, J. P., Boyle, M. P., Dunitz, J. M., Durie, P. R., ... Ramsey, B. W. (2010). Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *The New England Journal of Medicine*, 363(21), 1991–2003.
- Amaral, M. D. (2005). Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? *Pediatric Pulmonology*, 39(6), 479–91.
- Amaral, M. D., Pacheco, P., Beck, S., Farinha, C. M., Penque, D., Nogueira, P., ... Rocio, V. (2001). Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J. Med. Genet.*, 38(11), 777–783.
- Beck, S., Penque, D., Garcia, S., Gomes, A., Farinha, C., Mata, L., ... Amaral, M. D. (1999). Cystic Fibrosis Patients With the 3272-26A → G Mutation Have Mild Disease , Leaky Alternative mRNA Splicing , and CFTR Protein at the Cell Membrane. *Hum Mutat*, 144, 133–144.
- Bobadilla, J. L., Macek Jr., M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.*, 19(6), 575–606.
- Bombieri, C., Claustres, M., De Boeck, K., Derichs, N., Dodge, J., Girodon, E., ... Jr, M. M. (2011). Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 10 Suppl 2, S86–102.
- Bonadia, L. (2011). *Correlação entre aspectos clínicos, moleculares e fisiológicos de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística de um centro de referência no Brasil*. State University of Campinas, SP, Brazil.
- Borowitz, D., Baker, S. S., Duffy, L., Baker, R. D., Fitzpatrick, L., Gyamfi, J., & Jarembek, K. (2004). Use of fecal elastase-1 to classify pancreatic status in patients with cystic fibrosis. *J. Pediatr.*, 145(3), 322–326.
- Boyle, M. P. (2003). Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 9(6), 498–503.

- Castellani, C., Cuppens, H., Macek Jr., M., Cassiman, J. J., Kerem, E., Durie, P., ... Assael, B. M. (2008). Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*, 7(3), 179–196.
- Clancy, J. P., Rowe, S. M., Accurso, F. J., Aitken, M. L., Amin, R. S., Ashlock, M. A., ... Konstan, M. W. (2011). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*, 67(1), 12–8.
- Cleveland, R. H., Zurakowski, D., Slattery, D., & Colin, A. A. (2009). Cystic fibrosis genotype and assessing rates of decline in pulmonary status. *Radiology*, 253(3), 813–21.
- Collins, F. S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256(5058), 774–779.
- Correia, C. (2005). *Prevalência de seis mutações no gene CFTR em portadores de Fibrose Cística na região de Campinas*. State University of Campinas, SP, Brazil.
- De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., & Sinaasappel, M. (2006). Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 61(7), 627–635.
- Debray, D., Kelly, D., Houwen, R., Strandvik, B., & Colombo, C. (2011). Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J Cyst Fibros*, 10, S29–S36.
- Derichs, N., Sanz, J., Von Kanel, T., Stolpe, C., Zapf, A., Tümmler, B., ... Ballmann, M. (2010). Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*, 65(7), 594–9.
- Ellitus, D. I. M. (2003). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26 (S1), S5–20.
- Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., ... Parad, R. B. (2008). Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatrics*, 153(2), S4–S14.
- Felício, V. (2011). *Estudo e Caracterização de mutações no gene CFTR em Tecido Nativo de Doentes*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa (Portugal).
- Hirtz, S., Gonska, T., Seydewitz, H. H., Thomas, J., Greiner, P., Kuehr, J., ... Mall, M. (2004). CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology*, 127(4), 1085–1095.
- Ho, L. P., Samways, J. M., Porteous, D. J., Dorin, J. R., Carothers, A., Greening, A. P., & Innes, J. A. (1997). Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 10(9), 2018–22.
- Kanis, J., & Glüer, C. (2000). An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int*, 11(3), 192–202.

- Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., ... Tsui, L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245, 1073–1080.
- Knowles, M., Gatzky, J., & Boucher, R. (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 305(25), 1489–95.
- Mall, M., Bleich, M., Schurlein, M., Kuhr, J., Seydewitz, H. H., Brandis, M., ... Kunzelmann, K. (1998a). Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am.J.Physiol.*, 275(6 Pt 1), G1274–81.
- Mall, M., Greger, R., Seydewitz, H., Kuehr, J., Brandis, M., & Kunzelmann, K. (1998b). Detection of defective cholinergic Cl⁻ secretion in human rectal biopsies for the diagnosis of Cystic Fibrosis. *J Clin Invest*, 102, 15–21.
- Mall, M., Bleich, M., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., & Kunzelmann, K. (1999). CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am.J.Physiol.*, 277(3 Pt 1), G709–16.
- Mall, M., Hirtz, S., Gonska, T., & Kunzelmann, K. (2004a). Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 165–169.
- Mall, M., Kreda, S. M., Mengos, A., Jensen, T. J., Hirtz, S., Seydewitz, H. H., ... Boucher, R. C. (2004b). The DF508 Mutation Results in Loss of CFTR Function and Mature Protein in Native Human Colon. *Gastroenterology*, 126, 32– 41.
- Mall, M., Wissner, A., Seydewitz, H. H., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., & Kunzelmann, K. (2000). Defective cholinergic Cl⁻ secretion and detection of K⁺ secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(4), G617–624.
- Moskowitz, S. M., Chmiel, J. F., Stern, D. L., Cheng, E., & Cutting, G. R. (2001). CFTR-related disorders. In R. Pagon, T. Bird, C. Dolan, & K. Stephens (Eds.), (updated 20.). University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Noone, P. G., & Knowles, M. R. (2001). “CFTR-opathies”: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir.Res.*, 2(6), 328–332.
- Parad, R. B., & Comeau, A. M. (2005). Diagnostic Dilemmas resulting from the Immunoreactive Trypsinogen/DNA Cystic Fibrosis Newborn Screening Algorithm. *Pediatrics*, 147(3 Suppl), S78–S82.
- Paranjape, S. M., & Zeitlin, P. L. (2008). Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 35(3), 116–23.
- Pratha, V. S., Hogan, D. L., Martensson, B. A., Bernard, J., Zhou, R., & Isenberg, J. I. (2000). Identification of transport abnormalities in duodenal mucosa and duodenal enterocytes from patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*, 118(6), 1051–1060.
- Ramalho, A. S., Beck, S., Meyer, M., Penque, D., Cutting, G. R., & Amaral, M. D. (2002). Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 27(5), 619–627.

- Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., ... Elborn, J. S. (2011). A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine*, 365(18), 1663–1672.
- Rich, D. P., Anderson, M. P., Gregory, R. J., Cheng, S. H., Paul, S., Jefferson, D. M., ... Welsh, M. J. (1990). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature.*, 347(6291), 358–363.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., ... Al., E. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.*, 245(4922), 1066–1073.
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., ... Al., E. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245, 1059–1065.
- Rosenstein, B. J., & Cutting, G. R. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J.Pediatr.*, 132(4), 589–595.
- Roth, E. K., Hirtz, S., Duerr, J., Wenning, D., Eichler, I., Seydewitz, H. H., ... Mall, M. A. (2011). The K Channel Opener 1-EBIO Potentiates Residual Function of Mutant CFTR in Rectal Biopsies from Cystic Fibrosis Patients. *PloS One*, 6(8), e24445.
- Rowe, S. M., Miller, S., & Sorscher, E. J. (2005). Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*, 352(19), 1992–2001.
- Schaedel, C., de, M. I., Hjelte, L., Johannesson, M., Kornfalt, R., Lindblad, A., ... Holmberg, L. (2002). Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Pediatr.Pulmonol.*, 33(6), 483–491.
- Sermet-gaudelus, I., Girodon, E., Roussel, D., Deneuville, E., Bui, S., Huet, F., ... Georges, M. (2010). Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax*, 65(6), 539–44.
- Shah, S. (2011). VX-770, a CFTR potentiator, may have a potential clinical benefit in a subgroup of people with cystic fibrosis. *Thorax*, 66(11), 984.
- Shwachman, H., & Kulczycki, L. (1958). Long term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child.*, 96, 6–15.
- Standaert, T. A., Boitano, L., Emerson, J., Milgram, L. J., Konstan, M. W., Hunter, J., ... Knowles, M. R. (2004). Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr.Pulmonol.*, 37(5), 385–392.
- Strom, C. M., Huang, D., Chen, C., Buller, A., Peng, M., Quan, F., ... Sun, W. (2003). Extensive sequencing of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene: assay validation and unexpected benefits of developing a comprehensive test. *Genet.Med.*, 5(1), 9–14.

- Taylor, C. J., Hardcastle, J., & Southern, K. W. (2009). Physiological Measurements Confirming the Diagnosis of Cystic Fibrosis: the Sweat Test and Measurements of Transepithelial Potential Difference. *Paediatr Respir Rev*, 10, 220–226.
- Van Barneveld, A., Stanke, F., Ballmann, M., Naim, H. Y., & Tummeler, B. (2006). Ex vivo biochemical analysis of CFTR in human rectal biopsies. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1762(4), 393–397.
- Van Barneveld, A., Stanke, F., Tamm, S., Siebert, B., Brandes, G., Derichs, N., ... Barneveld, A. Van. (2010). Functional analysis of F508del CFTR in native human colon. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(11), 1062–9.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P. D. J., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., ... Goor, F. Van. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18825–30.
- Walker, L. C., Venglarik, C. J., Aubin, G., Weatherly, M. R., McCarty, N. A., Lesnick, B., ... Sorscher, E. J. (1997). Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 155(5), 1684–1689.
- Wallace, H., Barker, P., & Southern, K. (2003). Nasal airway ion transport and lung function in young people with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 168(5), 594–600.
- Yu, H., Burton, B., Huang, C.-J., Worley, J., Cao, D., Johnson, J. P., ... Van Goor, F. (2012). Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, Jan 30. [Epub ahead of print].

3.2. Capítulo 2: Rectal Forceps Biopsy Procedure in Cystic Fibrosis: Technical Aspects and Patients Perspective for Clinical Trials Feasibility

Manuscript was published in *BMC Gastroenterology* (2013), and included here with minor alterations:
Servidoni MF, Sousa M, Vinagre AM, Cardoso SR, Ribeiro MA, Meirelles LR, de Carvalho RB, Kunzelmann K,
Ribeiro AF, Ribeiro JD, Amaral MD.

Rectal forceps biopsy procedure in Cystic Fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility. BMC Gastroenterol. (2013) 13(1):91.

3.2.1 Summary

Background: Measurements of CFTR function in rectal biopsies *ex vivo* have been used for diagnosis and prognosis of Cystic Fibrosis (CF) disease. Here, we aimed to evaluate this procedure regarding: i) viability of the rectal specimens obtained by biopsy forceps for *ex vivo* bioelectrical and biochemical laboratory analyses; and ii) overall assessment (comfort, invasiveness, pain, sedation requirement, etc.) of the rectal forceps biopsy procedure from the patients perspective to assess its feasibility as an outcome measure in clinical trials.

Methods: We compared three bowel preparation solutions (NaCl 0.9%, glycerol 12%, mannitol), and two biopsy forceps (standard and jumbo) in 580 rectal specimens from 132 individuals (CF and non-CF). Assessment of the overall rectal biopsy procedure (obtained by biopsy forceps) by patients was carried out by telephone surveys to 75 individuals who underwent the sigmoidoscopy procedure.

Results: Integrity and friability of the tissue specimens correlate with their transepithelial resistance ($r=-0.438$ and -0.305 , respectively) and are influenced by the bowel preparation solution and biopsy forceps used, being NaCl and jumbo forceps the most compatible methods with the electrophysiological analysis. The great majority of the individuals (76%) did not report major discomfort due to the short procedure time (max 15 min) and considered it relatively painless (79%). Importantly, most (88%) accept repeating it at least for one more time and 53% for more than 4 times.

Conclusions: Obtaining rectal biopsies with a flexible endoscope and jumbo forceps after bowel preparation with NaCl solution is a safe procedure that can be adopted for both adults and children of any age, yielding viable specimens for CFTR bioelectrical/ biochemical analyses. The procedure is well tolerated by patients, demonstrating its feasibility as an outcome measure in clinical trials.

Keywords: Quality control, patient comfort, forceps, outcome measures clinical trial, rectal biopsy

3.2.2 Introduction

Cystic Fibrosis (CF), the most common severe autosomal recessive disease of Caucasian populations, is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene encoding a chloride (Cl⁻) channel expressed at the apical membrane of epithelial cells, a major regulator of salt and water transport in epithelia (Rich et al., 1990). CF is dominated by respiratory disease but other organs are also affected including the pancreas, intestine and sweat gland as well as male reproductive tract (Collins, 1992).

Although the clinical diagnosis of classic (severe) forms of CF is straightforward, for other patients there is wide variability in the clinical presentation and organ involvement, thus making the CF diagnosis more challenging (Rosenstein & Cutting, 1998; Farrell et al., 2008; Wallis, 2003; Paranjape & Zeitlin, 2008; Boyle, 2003). Moreover, increasing numbers of asymptomatic patients are currently identified through extended programs of CF newborn screening (Farrell et al., 2008; De Boeck et al., 2006; Taylor et al., 2009; Com et al., 2010; Sermet-Gaudelus et al., 2010).

One of the most useful laboratory parameters used for the diagnosis and prognosis of CF, is *ex vivo* assessment of CFTR-mediated Cl⁻ secretion channel in freshly collected rectal biopsies (De Boeck et al., 2006; Taylor et al., 2009; Hirtz et al., 2004; Mall et al., 2004a; Sousa et al., 2012; de Jonge et al., 2004; Derichs et al., 2010), which we have shown to constitute a sensitive, reproducible and robust predictive biomarker for the diagnosis and prognosis of CF disease (Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012).

Moreover, ongoing clinical trials of novel therapeutic CFTR-modulators require improved and robust biomarkers to adequately assess their *in vivo* efficacy on CFTR. Indeed, there is also great potential to exploit this method to pre-clinically assess compound efficacy directly on human tissues *ex vivo*, as we previously showed (Roth et al., 2011) or as a biomarker in clinical trials of novel CFTR-modulators (Accurso et al., 2010; Clancy et al., 2011; Shah, 2011). Moreover, it may even be used to evaluate patient/CFTR genotype responsiveness to a drug through a personalized-medicine approach.

For such disseminated usage of this method, standardized operational procedures (SOP) for bowel preparation and biopsing are essential to ensure good tissue viability for the

quantitative assessment of the bioelectric parameters (Mall et al., 2004a). Moreover, since the procedure involves biopsing, a somewhat invasive procedure possibly triggering psychological rejection, there should be clear information on how it is perceived from the patients' perspective (comfort, invasiveness, pain, sedation requirement, etc) to obtain an overall assessment of the method.

Our aim here was to evaluate (a) the technical procedure regarding the quality for bioelectrical/ biochemical laboratory analyses of 580 rectal specimens from 132 individuals (CF and non-CF), namely by comparing different bowel preparations and different biopsy forceps; and (b) to determine individuals' assessment regarding the rectal biopsy procedure feasibility to be possibly used as an outcome measure in (pre-)clinical trials, as described in other studies (Anton et al., 2011; McGowan et al., 2007).

Our results demonstrate that best tissue viability for Ussing chamber measurements results after bowel preparation with isotonic solution (NaCl 0.9%) and usage of jumbo (*vs* standard size) biopsy forceps allowing collection of larger specimens without disrupting tissue integrity. Data collected on patient's comfort show that the great majority of individuals (76%) did not report major discomfort due to the short procedure time (max 15 min) and considered it relatively painless (79%), regardless of sedation. Moreover, most individuals accept repeating the procedure another four times (53%), supporting the feasibility of the current approach as an outcome measure in (pre-)clinical trials.

3.2.3 Methods

Subjects

Access to human tissues used in this study received approval from the Research Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp, ref. 503/2007 – **Annex A**), in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association. Signed informed consent was obtained from all individuals (or parents/tutors, for those <18 yrs – **Annex B**). Altogether, 580 freshly excised rectal biopsies were analysed at Unicamp from 132 individuals, including CF patients (n=67) with previously established diagnosis (Sousa et al., 2012) (genotypes in **Appendix B – Table II** and in **Appendix A – Table I**, reproduced from Sousa et al., 2012) and age-matched non-CF individuals (n=65) undergoing biopsing for other clinical reasons and agreeing to participate in the study (**Figure 9**). The

number of biopsies found suitable for quantitative bioelectrical measurements was 404 (i.e., ~70%). Assessment of the overall rectal biopsy procedure by patients was carried out by telephone surveys to individuals (n=75) who underwent the sigmoidoscopy/rectal forceps biopsy procedure (**Figures 8 and 9**).

Bowel Preparation

Bowel preparation was done on-site (~30 min prior to sigmoidoscopy) by applying an enema of i) saline solution (0.9% NaCl, total volume: 0.25-1L); or ii) glycerinated solution (12% glycerol in distilled water, total volume: 0.25-1L), for individuals undergoing sigmoidoscopy; or iii) oral mannitol solution (20%, total volume: 0.5L on the previous day) for individuals undergoing colonoscopy (Figure 9). Satisfactory bowel cleaning was achieved in 99.24% (131/132) of cases. At our endoscopy unit, oral mannitol is used only when a complete cleaning of the bowel is required; while the routine solutions used for sigmoidoscopy are usually glycerinated solution or saline solution. These solutions are cheap and offer low risk of dehydration for the patient (especially for people that live in very hot climates, like Brazil). Also in the case of rectal biopsies, only the rectum needs to be cleaned, so performing a quick enema on-site prior to the procedure is adequate and also more comfortable for the patient.

Rectal Biopsies Procedure

When using jumbo forceps (Endoflex® 3.4mm; Voerde, Germany) a colonoscope with a working channel of 3.8mm Ø and an external diameter of 12.8mm (Fujifilm® EC-590ZWL; Tokyo, Japan) was used. For the standard forceps (Olympus® 2.5mm; Shinjuku, Tokyo, Japan) we used either a Olympus® (CV-VL model; Shinjuku, Tokyo, Japan) or a Pentax Ricoh® (FG-27X model, Tokyo, Japan) scope with a working channel of 2.8mm Ø and an external diameter of 9mm.

Individuals were examined in the left lateral decubitus position. The distal 10 cm of the scope was lubricated with a water-soluble jelly and it was then inserted into the rectum by exerting gentle pressure by the scope tip on the anal sphincter until it relaxed. Insertion of the scope was done as quickly as possible, thereby limiting patient discomfort. Once the scope is in the rectum (10 to 20 cm inserted), fluid that may be present was suctioned and the lumen was located and inspected by moving the tip of the scope. The normal rectal mucosa demonstrates a

non-friable vascular system. Little or no air insufflation was used to avoid abdominal pain and bowel distension and because it is easier to obtain superficial rectal biopsies. These were collected laterally at 15 to 20 cm from the anal verge in a low vascularized mucosa.

Superficial 4-6 rectal mucosa specimens (2-4 mm in diameter) were obtained by either jumbo or standard forceps with visual examination, avoiding the risk of bleeding, perforation or of collecting damaged tissue, and immediately stored in ice-cold RPMI1640 with 5% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS).

We aimed to compare different biopsy forceps, as suction biopsies are not in current use at our endoscopy unit. In a first stage, we used the Olympus® 2.5mm forceps (standard-oval without needle; required work channel size: 2.8mm Ø; Shinjuku, Tokyo, Japan) and in a second stage the Endoflex® 3.4mm (jumbo-oval without needle; required work channel size: 3.7mm Ø; Voerde, Germany) in order to obtain larger specimens, optimizing the adequacy of the specimens for functional and biochemical studies.

Sedation

From the 132 individuals enrolled in this study, 63 performed endoscopic procedures under sedation and 69 without. Intravenous sedation with midazolam (associated or not with meperidine) was performed for all individuals undergoing colonoscopy (n=28) for other reasons than the rectal biopsy procedure (these were all non-CF individuals).

Sigmoidoscopy was done with or without sedation depending if the individual was already performing other procedures (like gastrostomy or upper endoscopy, n=10) or depending on individuals' will, collaboration or anxiety (n=25, i.e., only 24% of the patients undergoing sigmoidoscopy preferred to be sedated). For children under 9 years old, the parents together with the paediatric gastro-endoscopists decided whether it was preferable to have sedation; while the individuals above 10 years old could choose to have sedation or not by themselves, because they had already a better understanding of the overall procedure. For those 35 individuals, sedation was performed as follows: a) intravenous sedation with midazolam (n=9); b) intravenous anaesthesia with propofol (n=2); c) intravenous anaesthesia with propofol + alfentanil (n=5); d) sevoflurane (with nitrous oxide 1:1) inhalation (n=8); and e) intravenous anaesthesia with propofol + sevoflurane inhalation (n=11). In general, individuals were monitored for blood pressure, pulse, oxygen saturation and ECG tracing by an anaesthologist. Children could also choose if they wanted their parents with them during the procedure or not.

Macroscopic Evaluation and Preparation

Prior to mounting in Ussing chamber, tissues were macroscopically evaluated regarding bleeding, mucus, biopsy thickness (presence of submucosa or not), and also for friability (tissue breakdown from manipulation), in a scale from 0 to 3 (from absence to clear presence of the descriptor), by two different technicians who were blinded for the individual condition (CF/non-CF), bowel preparation method and biopsy forceps used (**Figure 9**). Regarding tissue integrity resulting from the biopsing procedure, the scale was inverted to facilitate the technicians' evaluation, i.e., 0 means full integrity of the specimen while 3 means that the tissue is fully disrupted (i.e. integrity is not present). Data on specimens' macroscopic evaluation were obtained for 107 individuals and was averaged for 2-5 biopsies/ individual to obtain a single value per individual.

To minimize edge damage, we mount tissues under a stereomicroscope allowing for optimal orientation of the small tissue specimen over insert opening (circular aperture of 0.95 mm²), appropriate for Ussing chamber measurements, and preventing tissue damage during manipulation with instruments, as before (Mall et al., 2004a; Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012).

Ussing chamber measurements

Tissues were equilibrated in the micro-Ussing chambers for 30 min in perfused Ringer solution (in mmol/L: NaCl 145, KH₂PO₄ 0.4, K₂HPO₄ 1.6, D-glucose 5, MgCl₂ 1, Ca²⁺-gluconate 1.3, pH 7.40, at 37° C) as previously described (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 2004; Sousa et al., 2012). Luminal and basolateral surfaces of the epithelium were perfused continuously (5 mL/min). Typically, we perform experiments under open-circuit conditions, which resemble the *in vivo* situation more closely than short-circuit conditions. This approach may contribute to longer viability and a larger magnitude of drug responses (Hirtz et al., 2004; Mall et al., 2004; Sousa et al., 2012). Transepithelial resistance (R_{te}) was determined by applying short (1 s) current pulses (0.5 μ A) and the corresponding changes in transepithelial voltage (V_{te}) were recorded continuously. Values for the transepithelial voltage (V_{te}) were referred to the serosal side of the epithelium. The equivalent short-circuit current (I_{sc}) was calculated according to Ohm's law ($I_{sc} = V_{te}/R_{te}$). Measurements of basal R_{te} were used to assess tissue viability, after appropriate

correction for fluid resistance. To control for sample-to sample variability of *ex vivo* tissue specimens, we generally perform diagnostic bioelectric measurements on 2-5 biopsies per individual and data were averaged to obtain a single value for each individual.

Histology preparations

One out of the 4–6 rectal specimens collected per individual was fixed in 4% formaldehyde, embedded in paraffin and cut in thin sections (2–3 μM) for histological observation. Sections were then deparaffinized in xylene (twice, 10 min), re-hydrated with absolute ethanol (twice, 5 min), 95% ethanol (2 min), 70% ethanol (2) min and briefly rinsed with distilled water and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Tricome's Masson as previously (Mall et al., 2004a). Slides were mounted with xylene-based mounting medium. Again, pathologists assessed specimens blindly as above and data was obtained for 78 individuals.

Western blot

Rectal biopsy specimens from normal individuals and patients with established CF genotypes (kept at -80°C after bioelectrical measurements) were homogenized in ice-cold 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA containing a protease inhibitor cocktail (Roche®, Basel, Switzerland). This material was then incubated 40 minutes with 1% (w/v) Nonidet P-40, 1% (w/v) sodium deoxycholate and 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate. Insoluble material was removed by centrifugation and Laemmli buffer was added to supernatants.

All protein extracts were quantified by modified micro-Lowry method and subjected to sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (7% acrylamide) separation (Farinha et al., 2004).

Western blots were probed with a cocktail (1:2000 dilution) of the monoclonal antibodies M3A7 and MM13-4 (Chemicon®, Millipore, Billerica, MA, USA) or anti-CFTR antibodies 570 and 596 (Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MA, USA) which recognize separate CFTR epitopes to increase sensitivity to detect native CFTR protein (Mendes et al., 2004a; Mall et al., 2004b)(70 μg of total protein extract was applied in the gel). Chemiluminescent detection was performed using Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Rockford, IL, USA) or ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software system (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Immunohistofluorescence

Thin sections (3-4 μm) of frozen rectal tissues were mounted on glass slides and stored at -80°C until immunofluorescence analyses. Briefly, sections were hydrated in phosphate-buffered saline for 5 minutes and fixed in methanol at -20°C for 10 minutes. After a blocking step (30 minutes in 1% (w/v) bovine serum albumin), sections were incubated with monoclonal anti-CFTR antibody 570 (Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, MA, USA) diluted 1:150 for 2h at room temperature (Mendes et al., 2004b) and after with Alexa 488-fluorescein labelled (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:300 for 1h, and mounted in Vectashield containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to label nuclei (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immunofluorescence staining was observed and recorded on a confocal microscope Leica TCS SPE (Leica, Jena, Germany).

Questionnaire used for patients' assessment of the rectal biopsy procedure

Individuals were approached by telephone by two researchers that did not have contact with the rectal biopsy procedure to evaluate the overall procedure from bowel preparation to collection of the biopsy (full questionnaire in **Figure 8**). Data were obtained for 75 individuals, divided into four age groups, namely (yrs): 0-9 (n=21); 10-19 (n=33); 20-29 (n=7); ≥ 30 (n=14). Most patients were children (median age=13 yrs). For children under 9 years old, the parents were asked to answer the questions as these children are very young to fully understand the procedure; while the individuals above 10 years old gave the responses themselves.

Although several attempts have been made to define patient satisfaction, an acceptable definition is that it represents a patient's cognitive or emotional evaluation of a health-care provider's performance and is based on relevant aspects of a patient's experiences and perceptions (Maciejewski et al., 1997). Thus, different domains of assessment with gastrointestinal endoscopy procedures were described (Yacavone et al., 2001) and may include (i) the quality of care (endoscopy staff and environment); (ii) the comfort and tolerability of the procedure; (iii) the provision of an adequate explanation of the procedure; (iv) communication with the physicians before and after the procedure; and (v) waiting time or delays.

Here, we focus on the comfort and tolerability of rectal biopsy procedure using a questionnaire covering: i) the choice of being or not sedated; ii) the evaluation of the discomfort of the overall procedure, including the monitoring, bowel preparation, rectoscopy, biopsing and sedation procedure; iii) comparison of the rectal biopsy procedure with other clinical and/or

research exams such as nasal potential difference, nasal brushing, spirometry, sweat test, bronchoscopy and blood collection; iv) classification of the pain deriving from the procedure; v) the concerns with this type of exam; and vi) the will to repeat the procedure if used as a research procedure (**Figure 8**). All subjects enquired had undergone at least blood draws and sweat-Cl⁻ testing for comparison with rectal biopsy (answers reported as "not applicable" were referred to individuals that were not able to establish a clear comparison, because they did not remind very clearly these procedures).

This survey was applied to a total of 75 individuals: 60 CF patients and also 15 non-CF individuals. At the time of the survey, these 15 individuals were reported as CF-suspicious patients that had also undergone other common CF medical examinations, like sweat-test or spirometry, and thus included in this study. Only later, they were reported as non-CF individuals.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SPSS software (v. 19; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and a p -value < 0.05 was accepted to indicate statistical difference. Unless otherwise stated, data are shown as mean + SEM (n = number of individuals/specimens studied).

Pearson coefficients (r) were used to find correlations and partial correlations between descriptors for macroscopic evaluation and R_{te} of biopsies. ANOVA, with a Bonferroni *post hoc* correction when appropriated, was used to find differences between groups' means with a 90% confidence interval. For Crosstabs regarding patients questionnaires, Pearson Chi-Square Tests were used to determinate independence between the variables analysed. Monte Carlo estimates of the exact p -value are provided whenever the data are too sparse or unbalanced for the asymptotic results to be reliable.

Chemicals and Compounds

All chemicals (highest available purity) were from Sigma-Aldrich® (St Louis, MI, USA) or Merck® (Darmstadt, Germany) except for culture media (GIBCO®/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Figure 8: Rectal Biopsy Procedure Patient Assessment Questionnaire.

Rectal Biopsy Procedure Patient Assessment Questionnaire	
Subject Name _____	Procedure Date: _____
Gender: _____	Birth Date: _____
1. Was it required to use sedation? Yes / No	
2. Please classify the overall rectal biopsy procedure as: A) Very uncomfortable B) Somewhat uncomfortable C) Not uncomfortable	
3. Regarding the overall procedure, that includes: i) the monitoring ii) the bowel preparation iii) the sigmoidoscopy iv) the biopsy v) the sedation (if used)	
which one(s) did you consider to be: A) Not uncomfortable B) The least uncomfortable C) The most uncomfortable	
4. Regarding other clinical and/or research procedures that you have experienced, please classify the rectal biopsy procedure as being: A) Less unpleasant or B) More unpleasant	
than: i) Nasal potential difference measurement ii) Nasal brushing iii) Spirometry iv) Sweat test v) Bronchoscopy vi) Blood collection	
5. Have you felt some pain during the biopsing procedure? Yes / No	
In case of a positive response, please classify your pain as: A) Very painful B) Acceptable Pain C) Almost unpainful	
6. What bothered you more in this procedure: the <i>a priori</i> presumption that this would be an uncomfortable and painful procedure or the preconception and taboo of a rectal exam? _____	
7. If the rectal biopsy was to be used as a future outcome measure in clinical trials, how many times do you think you would be willing to have it performed? ____ None ____ One time ____ Two times ____ Three times ____ Four times	
8. Please express any additional comment you would like to provide us relative to this procedure. _____	

3.2.4 Results

A flow-chart summarizing the technical biopsying aspects assessed in the present study is shown in **Figure 9**.

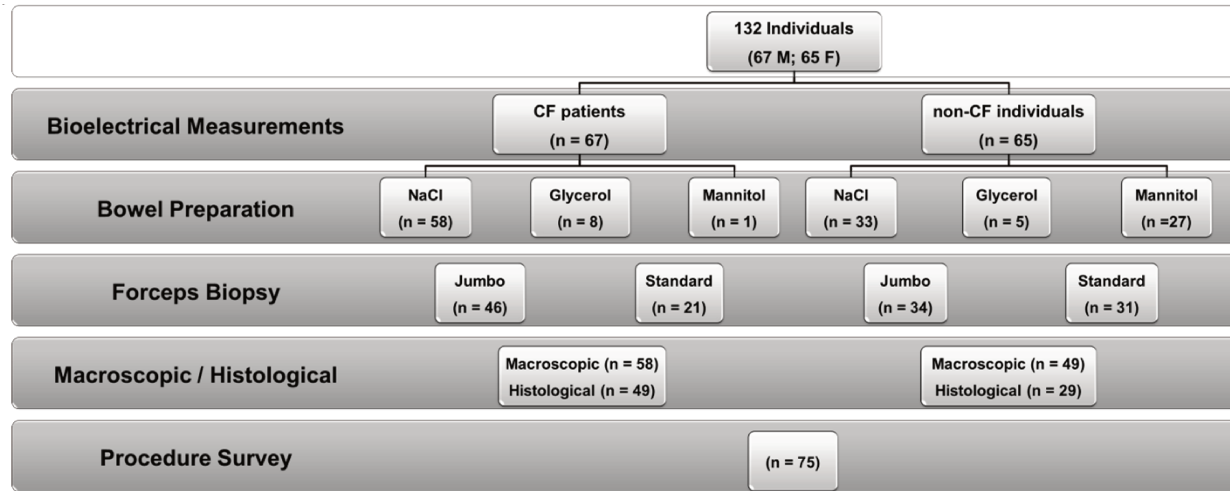


Figure 9: Flow-chart of the technical biopsying aspects assessed in the present study. Bioelectrical measurements were performed for rectal biopsies (n = 580) from all the individuals enrolled in the study (n = 132) to assess tissue viability (Sousa et al., 2012). Bowel preparation included enemas of either NaCl 0.9%, glycerol 12% (v/v) or oral mannitol 20% (w/v) solutions. Two different biopsy forceps were tested, namely jumbo (3.4mm Ø) and standard (2.5mm Ø), independently of bowel preparation. Macroscopic and histologic evaluation of rectal biopsies was achieved for 107 and 78 individuals, respectively. Patient assessment surveys were carried out for 75 individuals undergoing sigmoidoscopy with rectal biopsy collection, divided into 4 age groups, namely (yrs): 0-9; 10-9; 20-29; ≥30.

Bowel preparation and biopsy forceps

The bowel cleaning procedures, consisting in administration of an oral laxative (for colonoscopy) or by enema (for sigmoidoscopy) allowed equally good visualization of the rectal mucosa and forceps during the sigmoidoscopy/ colonoscopy procedure. Expectedly, jumbo biopsy forceps (3.4mm Ø) generated larger specimens than standard forceps (2.5mm Ø), thus facilitating the mounting of the tissue in Ussing chamber inserts.

Data referring to bowel preparation (**Tables 7 and 8**) show that there are statistically significant differences ($p=0.054$, 90% confidence interval) for tissue integrity between the preparations using NaCl 0.9% (1.19 ± 0.12) and glycerol 12% (1.82 ± 0.21). Oral mannitol was not statistically different from isotonic saline, independently of the biopsy forceps used (**Table 7**).

Table 7: Summary of macroscopic evaluation data and bioelectrical measurements (R_{te}) of rectal biopsies vs. bowel preparation and biopsy forceps.

Bowel Preparation		NaCl 0.9%		Glycerol 12%		Mannitol 20%	
Biopsy Forceps		Jumbo	Standard	Jumbo	Standard	Jumbo	Standard
Tissue integrity		1.00±0.11	2.00±0.35	1.48±0.31	2.21±0.23	1.02±0.02	1.97±0.30
Friability		1.23±0.12	1.36±0.24	1.50±0.31	1.81±0.22	1.13±0.33	1.33±0.25
Bleeding		1.01±0.08	1.21±0.18	1.27±0.21	1.16±0.29	1.05±0.22	0.83±0.32
Mucus		1.12±0.11	1.18±0.17	0.91±0.24	0.88±0.13	0.74±0.13	1.06±0.13
Sub-mucosa (n)	Yes	16	3	3	1	2	1
	No	42	9	4	4	12	10
$R_{te} (\Omega.cm^2)$		21.82±1.03	14.37±1.21	18.75±2.66	13.57±2.70	18.69±0.98	13.32±1.11

NOTE: Results are mean ± SEM; n = 107.

Table 8: Summary of macroscopic evaluation data and bioelectrical measurements (R_{te}) of rectal biopsies vs. bowel preparation.

	NaCl 0.9%	Glycerol 12%	Mannitol 20%
Tissue integrity	1.19 ± 0.12	1.82 ± 0.21	1.55 ± 0.21
Friability	1.26 ± 0.10	1.65 ± 0.19	1.24 ± 0.19
Bleeding	1.04 ± 0.07	1.22 ± 0.17	0.99 ± 0.18
Mucus	1.13 ± 0.09	0.89 ± 0.14	0.88 ± 0.10
$R_{te} (\Omega.cm^2)$	19.12 ± 0.87	16.36 ± 1.96	16.20 ± 0.89

NOTE: Results are mean ± SEM; n = 107. ANOVA analyses indicates statistical differences between distribution of among the three groups for bowel preparation (p=0.039). Bonferroni post hoc test shows that difference is between NaCl 0.9% and Glycerol 12% (p=0.054; 90% confidence interval).

Regarding biopsy forceps, mean values for tissue integrity (Jumbo=1.07±0.09 vs Standard=2.04±0.18) and also for R_{te} (Jumbo=20.97±0.81 $\Omega.cm^2$ vs Standard=14.01±0.86 $\Omega.cm^2$) are also statistically different for the isotonic saline and glycerol procedures (p=5.51×10⁻⁷ and p=8.42×10⁻⁸, respectively, **Tables 7 and 9**). Friability (i.e. tissue susceptibility to breakdown with manipulation) is the only parameter significantly affected by the presence of sub-mucosa (**Table 10**, p=0.008), but this may result from more tissue manipulation being required to remove the

sub-mucosa. Regarding bleeding and mucus, their presence/abundance are not influenced by neither bowel preparation nor biopsy forceps (**Table 7**).

Table 9: Summary of macroscopic evaluation data and bioelectrical measurements (R_{te}) of rectal biopsies vs. biopsy forceps.

	Jumbo	Standard
Tissue integrity	1.07 ± 0.09	2.04 ± 0.18
Friability	1.26 ± 0.10	1.47 ± 0.15
Bleeding	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.14
Mucus	1.02 ± 0.08	1.09 ± 0.09
$R_{te} (\Omega.cm^2)$	20.97 ± 0.81	14.01 ± 0.86

NOTE: Results are mean $\pm$ SEM; n=107. There are significant differences in tissue integrity ($p=5.51 \times 10^{-7}$) and also between means of R_{te} ($p=8.42 \times 10^{-8}$) for biopsy forceps.

Table 10: Summary of macroscopic evaluation data and bioelectrical measurements (R_{te}) of rectal biopsies vs. presence of sub-mucosa.

	Sub-mucosa presence	
	Yes	No
Tissue integrity	1.49 ± 0.16	1.32 ± 0.12
Friability	1.65 ± 0.18	1.18 ± 0.09
Bleeding	1.15 ± 0.14	1.01 ± 0.07
Mucus	1.20 ± 0.16	0.97 ± 0.06
$R_{te} (\Omega.cm^2)$	20.11 ± 1.45	18.95 ± 0.91

NOTE: Results are mean $\pm$ SEM; n = 107. Statistically significant differences were found between mean of friability regarding the presence of sub-mucosa ($p=0.008$).

In addition, we also found statistically significant correlations (**Figure 10 and Table 11**) between R_{te} and tissue integrity ($r=-0.438$, $p=8.51 \times 10^{-5}$) and between R_{te} and friability ($r=-0.305$, $p=6.65 \times 10^{-3}$), which is supported by partial correlations with bowel preparation and biopsy

forceps. Data concerning presence/abundance of blood and mucus do not correlate with tissue viability- R_{te} (Figure 10 and Table 11).

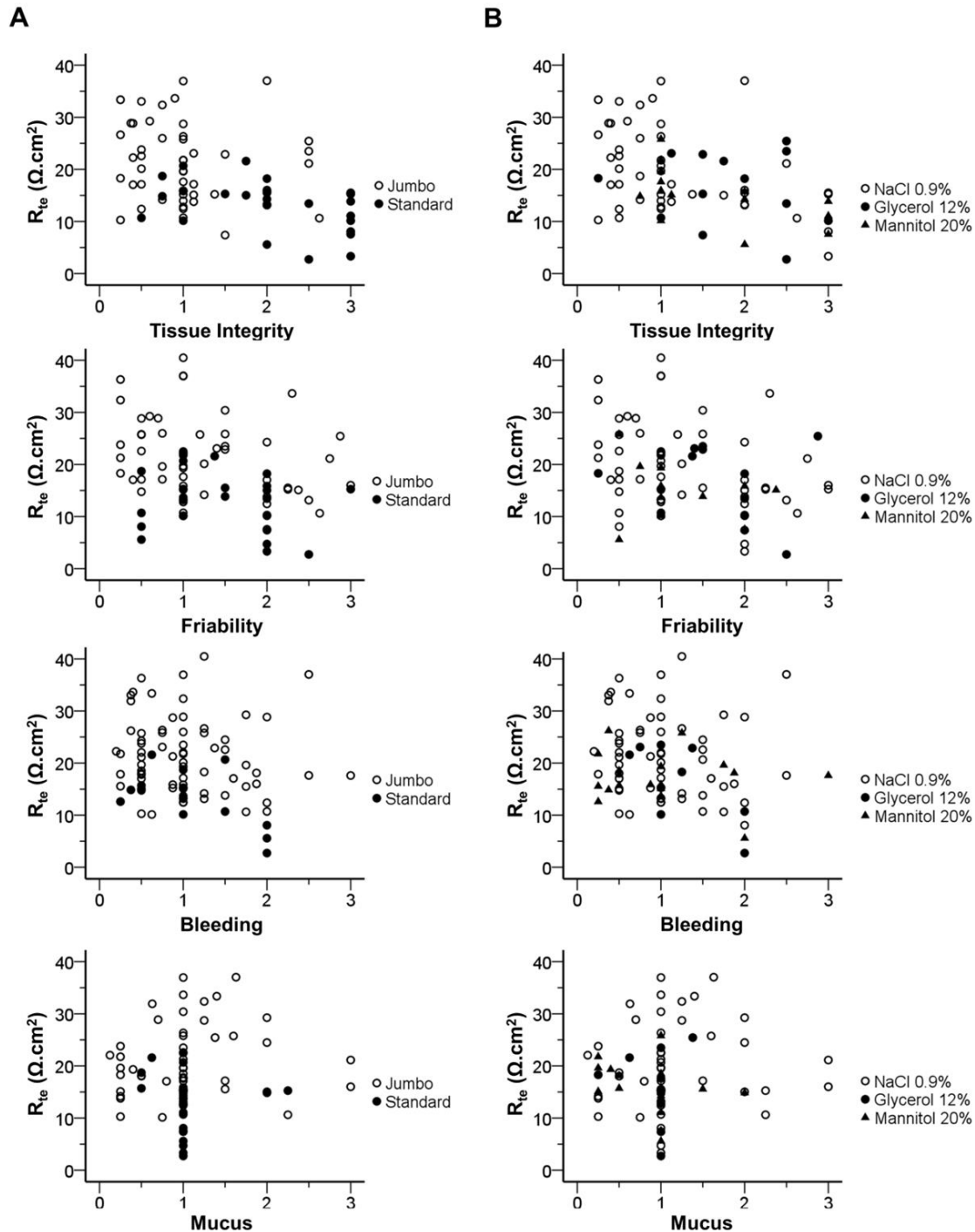


Figure 10: Correlations between tissue transepithelial resistance (R_{te}) and macroscopic descriptors. (tissue integrity, friability, bleeding and mucus) according to (A) biopsy forceps and (B) bowel preparation (n = 107 individuals).

Table 11: Summary of the correlations and partial correlations (by bowel preparation and biopsy forceps) between tissue transepithelial resistance (R_{te}) and macroscopic evaluation of biopsies.

	Transepithelial resistance (R_{te})	
	Pearson (r)	p-value
Tissue integrity	-0.438	8.51×10^{-5}
<i>Bowel preparation</i>	-0.403	3.74×10^{-4}
<i>Biopsy forceps</i>	-0.244	0.036
Friability	-0.305	6.65×10^{-3}
<i>Bowel preparation</i>	-0.301	7.88×10^{-3}
<i>Biopsy forceps</i>	-0.277	0.015
Bleeding	-0.176	0.110
<i>Bowel preparation</i>	-0.185	0.093
<i>Biopsy forceps</i>	-0.182	0.100
Mucus	+0.078	0.507
<i>Bowel preparation</i>	+0.032	0.787
<i>Biopsy forceps</i>	+0.115	0.330

NOTE: Pearson (r) and p-values indicating significant correlations are highlighted

($n = 107$).

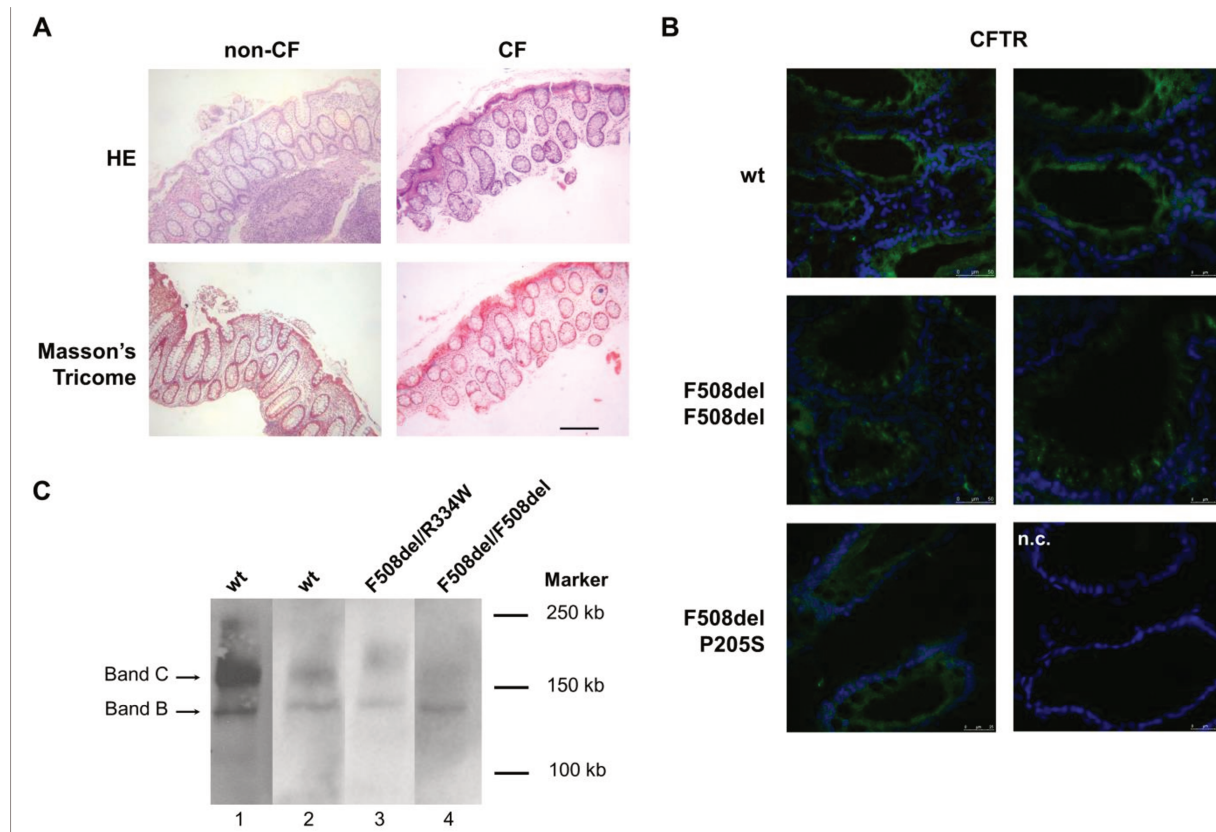
Histological and macroscopic evaluation of rectal tissues and biochemical analysis

Histological examination of rectal specimens revealed no obvious abnormalities and only some inflammatory cells were found, independently of both tissue origin (CF or non-CF) or bowel preparation (**Figure 11-A**).

Tissues were evaluated for integrity, friability, bleeding, mucus, and thickness of biopsy (presence of sub-mucosa or not) under a dissecting microscope by two different technicians in blinded way (**Table 7**). As shown above, the scores obtained from this evaluation were correlated with bowel preparation, biopsy forceps and measurements of transepithelial resistance (R_{te}) to assess tissue viability (**Figure 10 and Table 11**).

We have also used these native colonic tissues to further look at maturation pattern and localization of wt- and mutant-CFTR protein, which can serve as a valuable tool to evaluate the effects of CFTR-modulators together with Ussing chamber measurements of CFTR-mediated Cl^-

secretion. As shown in **Figure 11-B**, we were able to detect CFTR protein at the plasma membrane for both wt-CFTR and F508del/P205S-CFTR (P205S is a class IV mutation), but



F508del/F508del-CFTR was retained into cytoplasm, close to the basolateral membrane.

Figure 11: (A) Rectal biopsies (longitudinal cuts) were histologically evaluated by Hematoxylin-Eosin (HE) and Masson's Tricome stainings in non-CF and CF tissues. Images show healthy epithelia, with no fibrotic processes and only some inflammatory cells were detected. Images shown are representative of the total and correspond to biopsies from a non-CF individual (left) and a CF patient (right) performed with standard (3.4mm Ø) forceps after bowel preparation with glycerol (non-CF) or isotonic saline (CF). In HE-stained sections (top), nuclei are stained in blue and cytoplasm in red. In Tricome's Masson-stained sections (bottom) collagen (fibrotic biomarker) is stained in blue, nuclei in black, and muscle and cytoplasm in red. Black scale bar represents 250 µM. **(B) Immunohistofluorescence of rectal biopsies showing nuclei in blue (DAPI staining) and CFTR in green.** Images evidence CFTR at the membrane in a non-CF tissue (top panels) and also, albeit weaker, in a biopsy from a CF patient with the F508del/P205S-CFTR genotype (bottom panels). In contrast, a biopsy from a F508del-homozygous CF patient evidences intracellular CFTR staining (middle panels). A negative control (no primary antibody n.c.) was also performed. Scale bar represents 25 µm. **(C) Western blot of a single rectal biopsy** from non-CF individuals (wt-CFTR, lanes 1-2) and from a CF patient with F508del/R334W-CFTR genotype (lane 3) evidence the presence of both immature and mature forms of CFTR (bands B and C, respectively; and from a CF patient with the F508del/F508del-CFTR genotype (lane 4) evidencing only immature form (band B) which is characteristic of the endoplasmic reticulum (ER) and thus corroborating the traffic defect associated with this mutation.

These findings were in accordance with the maturation pattern of CFTR protein (**Figure 11-C**), which was found to be fully-glycosylated (presence of band C) for wt-CFTR and another class IV CFTR-mutant (R334W), but failed to mature in the biopsy from a F508del/F508del patient.

Patient safety and comfort with overall procedure

No major complications (perforation, haemorrhage) were reported following NaCl 0.9% bowel preparation or jumbo biopsy forceps (allowing larger and more viable rectal specimens), thus making this a safe procedure.

There was only one CF patient complaining about abdominal pain who was observed for 4h after the procedure, but had no other complications and recovered by then from such pain. This was the only patient with inappropriate bowel cleaning, where more insufflation had to be used in order to perform the procedure. We believe this was the reason for the abdominal pain. This patient also had a clinical history of surgical interventions for meconium ileus and colonic adhesions. We found no influence by usage of sedation in the procedure regarding tissue viability (data not shown).

Patients were asked by telephone to assess the rectal biopsy procedure by posing several questions targeting several aspects of patient assessment (see **Methods – Figure 8**). The questions were divided into 3 broad categories: *i*) procedural pain/discomfort and sedation requirement (questions 1, 2, 3 and 5); *ii*) comparison with other clinical/diagnosis procedures (question 4); and *iii*) acceptance towards the possible introduction of this method as an outcome measure in clinical trials (question 7). In addition, there was also a question regarding preconceptual concerns or discomfort and pain associated *a priori* with this procedure (question 6).

Data collected on patients' (dis)comfort show that 57/75 (76%) of the interviewed individuals did not report high levels of discomfort, independently of sedation or age, but shows statistically significant differences ($p = 0.032$) regarding gender (**Table 12**): as there were more female patients saying that the overall rectal biopsy procedure is "somewhat uncomfortable". Nevertheless, the majority of both female (32/41) and male (25/34) reported low levels of discomfort. Also, the great majority of the individuals inquired (78.7%) reported that this is a painless procedure, regardless of sedation, age or gender (**Table 12**). Only 2 individuals assessed the procedure as "Very painful" (data not shown). Moreover most of the individuals (53%) accept

repeating this procedure for four more times, while only a minority (12%) do not wish to repeat it (**Table 12**), also independently of sedation, age and gender.

Table 12: Evaluation of comfort, pain and future repetition of the rectal biopsy procedure assessed by patients by gender, age group and sedation (n=75).

		Comfort			Pain		Future Procedure				
		Very Uncomfortable (18)	Somewhat Uncomfortable (27)	Not Uncomfortable (30)	No (59)	Yes (16)	0 (9)	1 (14)	2 (9)	3 (3)	4 (40)
Gender	Female	9	20	12	34	7	3	8	6	0	24
	Male	9	7	18	25	9	6	6	3	3	16
Age Groups (years)	0–9	7	3	11	15	6	3	2	2	2	12
	10–19	6	16	11	27	6	5	7	5	1	15
	20–29	2	3	2	6	1	0	2	1	0	4
	≥ 30	3	5	6	11	3	1	3	1	0	9
Sedation	No	10	15	12	28	9	6	7	3	1	20
	Yes	8	12	18	31	7	3	7	6	2	20

NOTE: Results are n = number of individuals. Statistically significant differences were found between classification of procedure overall comfort regarding gender ($p = 0.032$).

When asked to indicate which steps of the procedure they considered as the least/ most uncomfortable (**Table 13**), data shows that "the monitoring" was considered by the highest percentage (89.3%) as "Not uncomfortable" (76%) or "Least uncomfortable" (13.3%), followed by "the biopsing" (70.7%) and "the bowel preparation" (70.7%), and finally "the sigmoidoscopy" (66.7%). For the individuals being sedated, "the sedation" step was also well-tolerated, as much as "the monitoring step" (**Table 13**). Furthermore, as somewhat expected, sedation significantly enhances the rate of "Not uncomfortable" responses regarding "the sigmoidoscopy" ($p = 0.016$) and "the biopsing" ($p = 0.003$) procedures. No differences were found regarding gender or age (**Table 13**).

Table 13: Evaluation of the overall rectal biopsy procedure (n=75).

	Not uncomfortable	Least Uncomfortable	Most uncomfortable	n.a.
Monitoring	57	10	6	2
Bowel preparation	27	26	20	2
Sigmoidoscopy	36	14	23	2
Biopsy	42	11	20	2
Sedation	28	4	5	38

NOTE: Results are n = number of individuals. Statistically significant differences were found between classification of comfort for sigmoidoscopy ($p = 0.016$) and biopsy ($p = 0.003$) regarding sedation. n.a. means not applicable.

Concerning the comparative assesment of the rectal biopsy procedure with other clinical / diagnosis examinations (**Table 14**), most of the individuals classified the overall rectal biopsy procedure as being "more unpleasant" than sweat test (76%), followed by spirometry (64%) and blood collection (53.3%), regardless of gender, age or sedation. No conclusions could be drawn concerning NPD, nasal brushing or bronchoscopy, because more than 65% of the individuals had not experienced those procedures or were unable to establish a comparison.

Table 14: Comparison of the rectal biopsy procedure with other clinical / diagnosis procedures (n=75).

	Less unpleasant	More unpleasant	n.a.
Nasal Potential Difference	9	11	55
Nasal Brushing	12	14	49
Spirometry	12	48	15
Sweat test	10	57	8
Bronchoscopy	3	7	65
Blood collection	25	40	10

NOTE: Results are n = number of individuals. n.a. means not applicable.

Finally, when patients were asked about their preconceptional concerns regarding the procedure (question 6), the reported answers were similar: 46.7% for preconception /taboo and 41.3% for discomfort /pain. The remaining 12% did not answer (data not shown).

3.2.5 Discussion

Measurements of CFTR function in rectal biopsy specimens have proven its value in the fine-diagnosis of patients with milder or "non-classical" forms of CF, in particular when sweat test results are equivocal or borderline and/or if CFTR-disease causing mutations are not readily identified by DNA mutation analysis (Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012; Mall et al., 2004a). This approach also serves as a sensitive test to predict the prognosis when rare CFTR mutations are not identified by standard screening tests (Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012). Compared to the airways, the rectal epithelium is easily accessible at any age, expresses higher levels of CFTR, thus increasing robustness of the measurements and, as shown here (**Figure 11-A**), does not undergo major secondary tissue destruction/remodelling as those occurring in CF airways (Mall et al., 2004a).

Because functional and biochemical data are not available for most rare mutations, these specimens can also be used to establish functional and biochemical correlations with rare CFTR genotypes (**Figure 11-B and C**). Furthermore, this approach may be used as well to validate efficacy of novel CFTR-modulator compound/drugs directly on human native tissues for such rare mutations (Accurso et al., 2010; Clancy et al., 2011; Shah, 2011). Indeed, rectal biopsies are already in use as outcome measures in clinical trials for other diseases (Anton et al., 2011; McGowan et al., 2007) and for some a high number of biopsies ($n = 28$) per patient has been reported without complications. The same can thus be translated into the CF field.

Since good tissue viability is critical for quantitative assessment of bioelectric responses our recommendation is that specimens are maintained in appropriate medium on ice until used in functional measurements, which should be performed immediately (Mall et al., 2004a). To minimize edge damage (and consequent liquid/ electric leakage), tissues should be mounted under a dissecting microscope for optimal orientation of biopsy on the insert opening and to prevent tissue damage with excessive instrument manipulation.

The present study, aimed to determine whether and how bowel preparation for sigmoidoscopy and choice of biopsy forceps influence tissue viability for subsequent laboratory analyses, in particular, bioelectric measurements. We compared two commonly used solutions for

bowel preparation, namely glycerol and isotonic saline enema (for sigmoidoscopy) as well as oral mannitol (for colonoscopy). Our data show that isotonic saline solution, which we speculate is less harmful for the mucosa, is superior to glycerol-based preparation, but there are no significant differences between NaCl-enema and oral mannitol. Indeed, there is a major difference between mean values for the tissue integrity parameter between biopsies obtained after NaCl- and glycerol-based bowel preparations, the latter severely compromising tissue viability (**Tables 7 and 8**).

Regarding the biopsing procedure, we choose to perform it with forceps instead of a suction device, as the forceps utilize endoscope which allows direct visualization of both the mucosa and the forceps during the procedure and identification of any abnormal vascular structures thus potentially increasing its safety profile. It also allows avoiding biopsing the same site twice. Excessive bleeding, although proven in this study as not being a problem, would be rapidly identified and could be immediately managed. Moreover, our goal was also to compare the forceps size (standard vs jumbo forceps) in terms of how sample size might affect its viability and also regarding safety of the procedure. Overall, mean values for tissue integrity (jumbo= 1.07 ± 0.09 vs standard= 2.04 ± 0.18) and also for R_{te} (jumbo= $20.97 \pm 0.81 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs standard= $14.01 \pm 0.86 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$) were shown to be statistically different ($p=5.51 \times 10^{-7}$ and $p=8.42 \times 10^{-8}$, respectively, **Tables 7 and 9**), with jumbo forceps providing the best results.

Importantly, data for both tissue integrity and friability show good correlations (positive and negative, respectively) with tissue viability (assessed by R_{te} measurements) and are influenced by bowel preparation and biopsy forceps (**Figure 10 and Table 11**). Our data also show that collection of superficial rectal biopsies with (jumbo/standard) forceps constitutes a safe procedure, as we observed no complications, similarly to what others previously reported for studies on Hirschsprung (Hirsch et al., 2011) or inflammatory bowel disease (Elmunzer et al., 2008).

Data concerning presence/abundance of bleeding and mucus do not correlate with tissue viability (R_{te}), but interestingly there is a trend positive correlation between mucus and R_{te} ($r=+0.078$), indicating that presence of mucus (i.e. probably resulting from a less "aggressive" bowel cleaning) could somehow serve to preserve tissue viability (**Figure 10 and Table 11**).

Therefore, performing bowel preparation with isotonic saline and obtaining the rectal biopsies with jumbo forceps are demonstrated to constitute the best combination for the procedure (**Table 7**) with the highest mean values for R_{te} ($21.82 \pm 1.03 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$) and the best for

tissue integrity (1.00 ± 0.11). On the other hand, usage of glycerol-based enema and smaller (standard) forceps produce the less viable tissues, namely (**Table 7**): worst tissue integrity (2.21 ± 0.23) and R_{te} ($13.57 \pm 2.70 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$), and highest friability (1.81 ± 0.22), thus rendering quantitative determination of CFTR-mediated Cl^- secretion less reliable. An alternative for bowel preparation in children could be sodium citrate + sodium lauryl sulfoacetate, together with glycerol + sorbitol ("Microlax[®]") or dioctyl sulfosuccinic acid sodium salt + sorbitol ("Clyssgo[®]"), which we had previously experienced to be less harmful for the mucosa if done the day before sigmoidoscopy (data not shown), probably allowing rectal mucosa to recover from this enema procedure. However, as these procedures were not rigorously assessed, they cannot be fully recommended.

The easy access to the patients rectum and the low innervation of this area minimizing pain, makes this approach to be expectedly well tolerated (Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012). Moreover, modern gastroenterology techniques and instruments currently applied in outcome measures for clinical trials have made this approach increasingly simpler and easier (Anton et al., 2011). Indeed, in the present study, sedation was used primarily to reduce anxiety and ensure cooperation. In cooperative, non-anxious patients, our experience recommends that the procedure is performed with no anaesthesia. The present study also shows that this procedure is safe to be applied from young children to adults (age range was 6 mo to 52 yrs). Although we have no experience, it also expected that it can be safely applied to newborns, namely those identified in increasing numbers as asymptomatic CF patients by the recently implemented extensive newborn screening programs, merely based on elevated serum concentrations of immunoreactive trypsinogen (IRT). Indeed, these patients, posing new challenges to the CF diagnosis and prognosis are likely candidates to undergo this procedure to find evidence of CFTR (dys)function.

Patient enquiries demonstrate that for the majority of the individuals (76%) the rectal biopsy procedure is not associated with high levels of discomfort due to the short procedure time (max 15 min), regardless of sedation (**Table 12**). Moreover, this shows to be also a relatively painless procedure, as 79% of the individuals did not report pain, **Table 12**). Nevertheless, "the sigmoidoscopy step" was associated with the highest level of discomfort (**Table 13**). Also, the individuals interviewed classified the rectal biopsy procedure as more unpleasant than sweat test, spirometry or blood collection (**Table 14**). But if these individuals are required to repeat the

biopsy procedure, despite some preconception concerns comprising prejudice and discomfort, they accept doing it up to four more times (53%).

In conclusion, results from the present study recommend that rectal biopsies for bioelectric measurements for CF studies should be obtained with a flexible endoscope and jumbo biopsy forceps after bowel preparation with NaCl isotonic solution to obtain viable specimens. The procedure is well tolerated from the patients' perspective, demonstrating its feasibility as an outcome measure in (pre-)clinical trials.

3.2.6 References

- Accurso, F. J., Rowe, S. M., Clancy, J. P., Boyle, M. P., Dunitz, J. M., Durie, P. R., ... Ramsey, B. W. (2010). Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *The New England Journal of Medicine*, 363(21), 1991–2003.
- Anton, P. A., Saunders, T., Elliott, J., Khanukhova, E., Dennis, R., Adler, A., ... McGowan, I. (2011). First Phase 1 Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Rectal Microbicide Trial Using UC781 Gel with a Novel Index of Ex Vivo Efficacy. *PloS One*, 6(9), e23243.
- Boyle, M. P. (2003). Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr.Opin.Pulm.Med.*, 9(6), 498–503.
- Clancy, J. P., Rowe, S. M., Accurso, F. J., Aitken, M. L., Amin, R. S., Ashlock, M. A., ... Konstan, M. W. (2011). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*, 67(1), 12–8.
- Collins, F. S. (1992). Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science.*, 256(5058), 774–779.
- Com, G. (2010). Cystic fibrosis newborn screening. *The Journal of the Arkansas Medical Society*, 106(9), 210–2.
- De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., & Sinaasappel, M. (2006). Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, 61(7), 627–635.
- De Jonge, H. R., Ballmann, M., Veeze, H., Bronsveld, I., Stanke, F., Tummler, B., & Sinaasappel, M. (2004). Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 159–163.
- Derichs, N., Sanz, J., Von Kanel, T., Stolpe, C., Zapf, A., Tümmler, B., ... Ballmann, M. (2010). Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*, 65(7), 594–9.

- Elmunzer, B., Higgins, P., Kwon, Y., & Al., E. (2008). Jumbo forceps are superior to standard large-capacity forceps in obtaining diagnostically adequate inflammatory bowel disease surveillance biopsy specimens. *Gastrointest Endosc*, 68, 273–8.
- Farinha, C. M., Penque, D., Roxo-Rosa, M., Lukacs, G., Dormer, R., McPherson, M., ... Amaral, M. D. (2004). Biochemical methods to assess CFTR expression and membrane localization. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 73–77.
- Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., ... Parad, R. B. (2008). Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatrics*, 153(2), S4–S14.
- Hirsch, B. Z., Angelides, A. G., Goode, S. P., & Garb, J. L. (2011). Rectal Biopsies Obtained With Jumbo Biopsy Forceps in the Evaluation of Hirschsprung Disease. *JPGN*, 52(4), 429–432.
- Hirtz, S., Gonska, T., Seydewitz, H. H., Thomas, J., Greiner, P., Kuehr, J., ... Mall, M. (2004). CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology*, 127(4), 1085–1095.
- Maciejewski, M., Kawiecki, J., & Rockwood, T. (1997). *Satisfaction in understanding health care outcomes research*. (pp. 67–89). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers Inc.
- Mall, M., Hirtz, S., Gonska, T., & Kunzelmann, K. (2004a). Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 165–169.
- Mall, M., Kreda, S. M., Mengos, A., Jensen, T. J., Hirtz, S., Seydewitz, H. H., ... Boucher, R. C. (2004b). The DF508 Mutation Results in Loss of CFTR Function and Mature Protein in Native Human Colon. *Gastroenterology*, 126, 32–41.
- McGowan, I., Elliott, J., Cortina, G., Tanner, K., Siboliban, C., & Al, E. (2007). Characterization of baseline intestinal mucosal indices of injury and inflammation in men for use in rectal microbicide trials (HIV Prevention Trials Network-056). *J.Acquir.Immune.Defic.Syindr.*, 46, 417–425.
- Mendes, F., Doucet, L., Hinzpeter, A., Ferec, C., Lipecka, J., Fritsch, J., ... Amaral, M. D. (2004a). Immunohistochemistry of CFTR in native tissues and primary epithelial cell cultures. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 37–41.
- Mendes, F., Farinha, C. M., Roxo-Rosa, M., Fanen, P., Edelman, A., Dormer, R., ... Amaral, M. D. (2004b). Antibodies for CFTR studies. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 69–72.
- Paranjape, S. M., & Zeitlin, P. L. (2008). Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 35(3), 116–23.
- Rich, D. P., Anderson, M. P., Gregory, R. J., Cheng, S. H., Paul, S., Jefferson, D. M., ... Welsh, M. J. (1990). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*, 347(6291), 358–363.

- Rosenstein, B. J., & Cutting, G. R. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J.Pediatr.*, 132(4), 589–595.
- Roth, E. K., Hirtz, S., Duerr, J., Wenning, D., Eichler, I., Seydewitz, H. H., ... Mall, M. A. (2011). The K Channel Opener 1-EBIO Potentiates Residual Function of Mutant CFTR in Rectal Biopsies from Cystic Fibrosis Patients. *PloS One*, 6(8), e24445.
- Sermet-gaudelus, I., Mayell, S. J., & Southern, K. W. (2010). Guidelines on the early management of infants diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *Journal of Cystic Fibrosis*, 9(5), 323–329.
- Shah, S. (2011). VX-770, a CFTR potentiator, may have a potential clinical benefit in a subgroup of people with cystic fibrosis. *Thorax*, 66(11), 984.
- Sousa, M., Servidoni, M. F., Vinagre, A. M., Ramalho, A. S., Bonadia, L. C., Felício, V., ... Amaral, M. D. (2012). Measurements of CFTR-Mediated Cl(-) Secretion in Human Rectal Biopsies Constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis. *PloS One*, 7(10), e47708.
- Sousa, M., Servidoni, M., Vinagre, A., Ramalho, A., Bonadia, L., Felício, V., ... Amaral, M. (2012). Measurements of CFTR-mediated Cl- Secretion in Human Rectal Biopsies Constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis. *PloS One*, 7(10), e47708.
- Taylor, C. J., Hardcastle, J., & Southern, K. W. (2009). Physiological Measurements Confirming the Diagnosis of Cystic Fibrosis: the Sweat Test and Measurements of Transepithelial Potential Difference. *Paediatr Respir Rev*, 10, 220–226.
- Wallis, C. (2003). Atypical cystic fibrosis—diagnostic and management dilemmas. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96(Suppl 43), 2–10.
- Yacavone, R., Locke, G., Gostout, C., & al, et. (2001). Factors influencing patient satisfaction with GI endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 53, 703–710.

3.3. Capítulo 3: Estimulação, Coleta e Dosagem de Eletrólitos no Teste do Suor: Características de Diferentes Centros

Manuscrito em preparação (2014):

Servidoni MF, Gomez CS, Marson FAL, Ribeiro MA, Vieira Jr FU, Toro ADC, Ribeiro JD, Ribeiro AF, GETESP (Grupo De Estudo do Teste do Suor de São Paulo): Damaceno N; Rodriguez JC; Ferrari G; Stepanian V; Salomão JB; Chiba S; Lorena S; Fernandes MI.

3.3.1 Sumário

Objetivo: Avaliar as etapas da realização do teste do suor (TS) em serviços capacitados para o diagnóstico de fibrose cística (FC) em um estado do Brasil.

Métodos: Foram visitados, 14 Serviços (9 públicos), onde é realizado o TS para diagnóstico de FC. Baseado em estudos internacionais, foi elaborado e aplicado um questionário qualitativo abrangendo as fases de estimulação, coleta e análise laboratorial do suor.

Resultados: Em 12/14 locais quem realizava o TS teve treinamento interno, em dois locais utilizavam normatização escrita e em um local os profissionais tinham conhecimento de “*guideline*” internacional do TS. Os centros pesquisados são responsáveis por aproximadamente 4.500 exames/ano sendo necessário repetição entre 10 a 50% dos testes, na maior parte das vezes, por sudorese insuficiente. Dois serviços privados (40% dos serviços privados) não utilizam nenhum equipamento para a estimulação. Todos os serviços possuem equipamento de estimulação sem certificação da agência reguladora ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e não têm registro no país, com tempo de uso que varia de 3 a 23 anos. 2/14 centros não estavam, realizando o TS por falta de insumos para estimulação e/ou dosagem do íon Clor (Cl⁻). Em 13/14 centros visitados foram constatados problemas relacionados à técnica de estimulação da sudorese, coleta do suor e/ou da dosagem do Cl⁻.

Conclusão: Não existe uniformidade nas etapas para a realização do TS nos diferentes centros avaliados. Com o aumento da demanda do TS após a implantação da Triagem Neonatal (TNN) para FC, é premente a necessidade de equipamento adequado de estimulação e dosagem do suor associado à normatização deste teste e treinamento de pessoal capacitado para a realização do mesmo.

Palavras-chave: Fibrose Cística, Teste do Suor, Centros de Referência, Pilocarpina.

3.3.2 Introdução

O Brasil tem dimensões continentais, população de 202 milhões de habitantes, três milhões de nascimentos/ano e almeja, até o final de 2014, implantar em todo o país a fase IV da triagem neonatal (TNN), que inclui a fibrose cística (FC), pela dosagem do tripsinogênio imunorreativo (IRT) realizada por duas dosagens no primeiro mês de vida.

A primeira IRT é realizada ao nascimento e é repetida se o resultado for alterado (cut off ≥ 70 ng/dL) dentro do primeiro mês de vida. Com dois valores de IRT alterados, o recém-nascido (RN) é encaminhado para a realização do teste do suor (TS) (Manual de normas técnicas do Ministério da Saúde-MS, 2004). O diagnóstico de FC é confirmado após dois TS alterados com $Cl^- \geq 60$ mEq/L (Portaria 288, MS). Valores duvidosos entre 30-60 mEq/L.

A partir da implementação da TNN em todo o país, a demanda pelo TS vai aumentar; soma-se a este fato o conhecimento atual e a identificação de formas não clássicas de FC e das doenças relacionadas a CFTR (CFTR-RD), onde o TS ainda é uma ferramenta valiosa (Cirili et al., 2008; Bombieri et al., 2011; Collie, 2014).

No contexto de população e área demográfica, São Paulo (SP), estado com 44 milhões de habitantes e miscigenação étnica; i.e. podendo representar todo território nacional; com aproximadamente 600.000 nascidos vivos/ano e população equiparável a Espanha e maior que o Canadá, Argentina e Austrália (**Tabela 15**), foi selecionado no presente estudo, para representar, o panorama de diagnóstico da FC pelo TS, no Brasil.

A TNN no Brasil apresenta um histórico com implantação em fases, sendo descrita brevemente no **suplemento 1 (Apêndice C)**.

Tabela 15. População de países com tamanho próximo à população do estado de São Paulo, Brasil

Países com população e equiparável ao estado de São Paulo - Brasil	População
 Austrália e Nova Zelândia ^a	22.918.688
 Canadá ^a	34.674.708
 Argentina ^a	41.118.986
 São Paulo ^b	43.663.669
 Espanha ^a	46.771.596
 Itália ^a	60.964.14

^a Fontes internacionais; ^b IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

A FC apresenta incidência de 1:2.500 a 1:6.000 nascidos vivos na Europa e Estados Unidos da América (EUA) e no Brasil os dados estimados são de 1:10.000 nascidos vivos (Ribeiro, Ribeiro & Ribeiro, 2002; Marson et al., 2013). Com base nesses dados, estima-se que no estado de SP ocorram 60 novos diagnósticos de FC por ano. Apesar do reconhecimento do defeito molecular no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) e dos estudos de eletrofisiologia, o TS é ainda fundamental para o diagnóstico da FC, sendo por muitos considerado o padrão-ouro (LeGrys, 1996; Mishra et al., 2005; Mishra et al., 2007; AACB, 2006; Green & Kirk, 2007). O TS está indicado mesmo com o *screening* positivo para duas mutações no gene *CFTR* (LeGrys et al., 2007).

A concentração elevada de Cl^- e de Sódio (Na^+) no suor se deve a um transporte anormal de íons que ocorre nas glândulas sudoríparas dos indivíduos com FC (Quinton, 2007).

O TS é baseado na técnica de iontoforese por pilocarpina (Gibson & Cooke, 1959) e deve ser realizado segundo normas rígidas de padronização, como publicado recentemente por Collie et al. (2014) o que é consenso em vários países: Itália, Reino Unido, EUA, Canadá, Austrália e Nova Zelândia (AACB, 2006; Cirili et al., 2008) e resumido em 23 diretrizes pela CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*) (LeGrys et al., 2007). Em contrapartida, no Brasil, até o presente momento, não sabemos como o TS vem sendo realizado.

Considerando a situação econômica e miscigenação da população brasileira (**Suplemento 2 – Apêndice D**) com grande variabilidade genética, a importância do TS para o diagnóstico da FC fica mais relevante (Mishra et al., 2005; Suarez-Kurtz et al., 2005), por ter menor custo comparado aos testes moleculares e por ser mais simples que os estudos de eletrofisiologia da *CFTR*, estes últimos ainda em implantação e desenvolvimento (Quinton et al., 2012; Sousa et al., 2012; Clancy et al., 2013).

Embora a realização do TS possa parecer simples, é artesanal e complexa (Gibson & Cooke, 1959; Collie et al., 2014).

O método tradicional, de iontoforese pela pilocarpina, descrito por Gibson e Cooke em 1959, com dosagem quantitativa de Cl^- por titulação manual (Schales & Schales, 1941) ou coulométrica utilizando-se cloridrômetro (LeGrys et al., 2007; Collie et al., 2014) é o praticado até os dias de hoje e a sua acurácia está diretamente relacionada ao empenho do profissional que o realiza (LeGrys et al., 2007; Cirili et al., 2008).

O sistema Macroduct® de estimulação e coleta desenvolvido em 1983 (Webster, 1983; Hammond et al., 1994), que padroniza de forma comercial as fases de estimulação (pilogel) e

coleta (espiral Macroduct®) diminuiu a variabilidade da técnica nestas duas fases do teste; porém, utiliza a condutividade para a dosagem de Cl^- (*sweat check analyzer*) (Mastella et al., 2000). A condutividade é um método qualitativo não aceito como método de diagnóstico para a FC, mas sim de triagem (Lezana et al., 2003; AACB, 2006; LeGrys et al., 2007; Collie et al., 2014). Mesmo em países onde a normatização do TS é bem estabelecida, existem diferenças de desempenho na realização e interpretação do TS entre diferentes centros (Baumer et al., 2003; Cirili et al., 2008). O presente estudo teve como objetivo conhecer como é realizado o TS no estado de SP, podendo refletir a realidade no Brasil.

3.3.3 Métodos

Em Setembro de 2012, foi realizado o I Encontro dos Centros de Referência do Estado de São Paulo na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), com participação da coordenadora estadual programa de TNN e de representantes dos sete centros de referência para tratamento de FC. O encontro teve como objetivo verificar se as dificuldades detectadas para a realização do TS que estavam sendo observadas em nosso centro de referência, também eram compartilhadas por outros serviços. Foi consenso que as dificuldades eram comuns e que, a realização do estudo, era pertinente.

Realizamos em 2013 um estudo analítico, observacional, de corte transversal em 14 locais que realizam o TS, nas cidades que contam com centros públicos de referência para atendimento de pacientes com FC no estado de SP. A distribuição dos centros está apresentada na **Figura 12**.

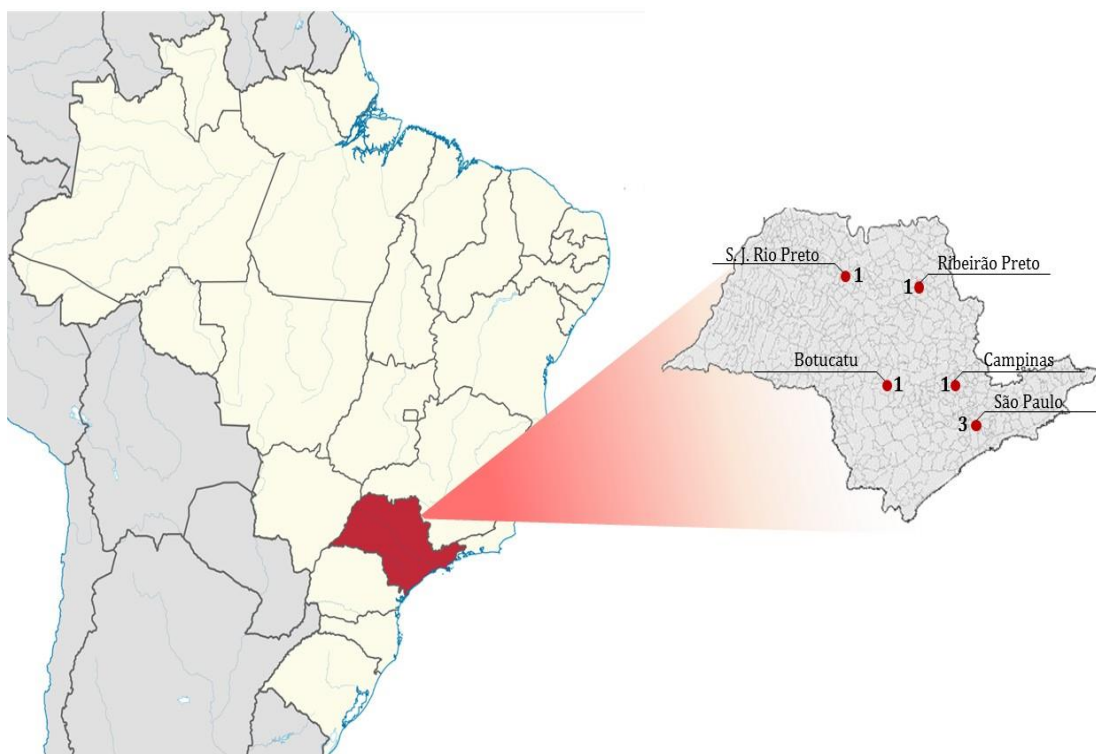


Figura 12: Mapa do Brasil e de São Paulo e localização das cidades do estado de São Paulo que contam com centros de referência para tratamento de pacientes com fibrose cística (FC) e quantidades de centros/ cidade: Cidade de São Paulo capital (n=3), Campinas (n=1), Ribeirão Preto (n=1), São José do Rio Preto (n=1), Botucatu (n=1).

Foram convidados 18 serviços nas cidades do estado de SP que contavam com centros de referência para tratamento de FC, sendo que 14 aceitaram participar e foram visitados (**Figura 13**). Todos os serviços públicos aceitaram participar do estudo (n=9); em dois deles havia dois laboratórios que realizavam o TS. Exceto em uma cidade (Botucatu), existiam serviços privados que realizavam o TS (n=9); e em outra (Ribeirão Preto) somente um serviço privado aceitou participar do estudo. Na capital nenhum aceitou e somente um serviço público estava em operação.

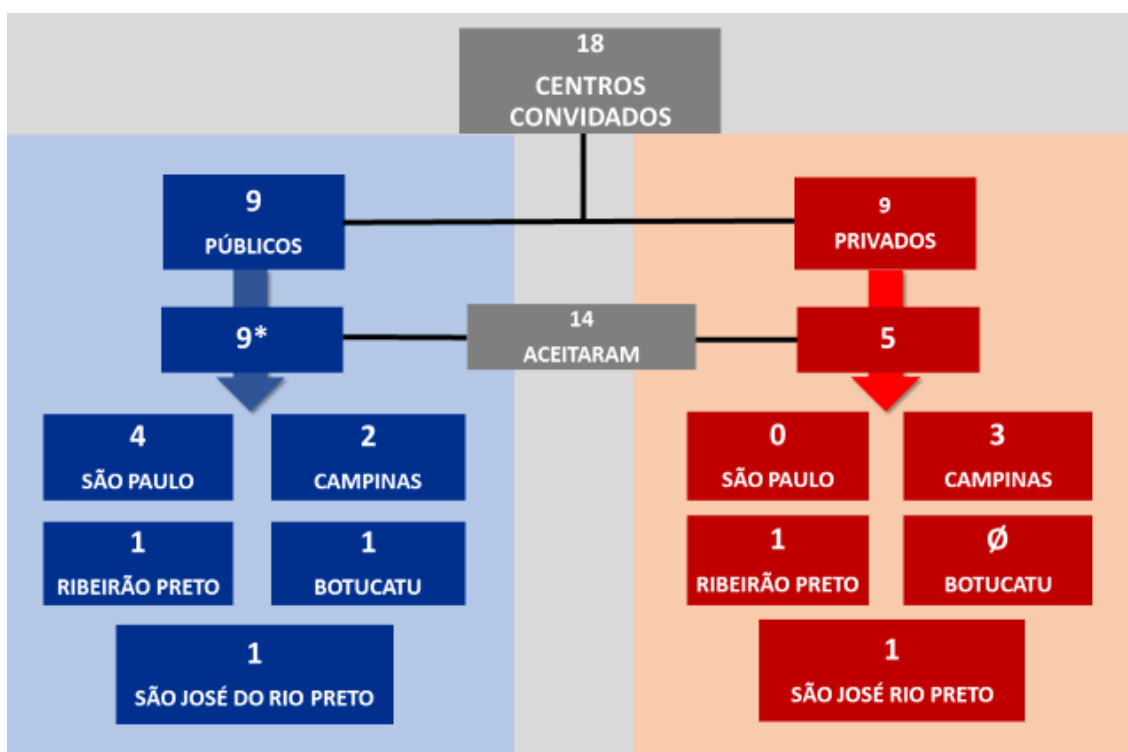


Figura 13: Relação dos centros participantes do estudo no estado de São Paulo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Parecer #86624 – **Anexo D**). Foi aplicado e assinado termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para todos os centros. Foi realizada uma visita a cada centro, com entrevista pessoal com os responsáveis pela realização do TS e aplicação de um questionário qualitativo, baseado em estudos e *guidelines* internacionais, composto por 54 perguntas abrangendo as fases de: (1) pré-estimulação; (2) estimulação e pesagem; (3) coleta do suor e (4) dosagem do Cl⁻. O questionário completo está no **suplemento 3 (Apêndice E)** (LeGrys et al., 2007; Cirili et al., 2008).

Os dados foram tabelados considerando as perguntas do questionário e apresentados em tabelas e figuras, como se segue.

3.3.4 Resultados

Dos 14 serviços visitados, 10 estavam operantes. Dos nove equipamentos Macroduct® disponíveis, sete não estavam em operação devido à falta de insumos ou quebra. A descrição dos locais incluídos no estudo está na **Tabela 16**.

Tabela 16: Descrição dos centros incluídos no estudo considerando a população

Municípios visitados	População*	Serviço convidado		Serviço visitado	
		Público (n)	Privado (n)	Público (n)	Privado (n)
São Paulo capital	11.253.503	4	3	4	0
Campinas**	1.080.113	2	3	2	3
Ribeirão Preto**	604.682	1	2	1	1
São José do Rio Preto	408.258	1	1	1	1
Botucatu	127.328	1	Não tem	1	0
Total (n)		9	9	9	5

*Fonte: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em parceria com os Órgãos Estaduais de Estatística, Secretarias Estaduais de Governo e Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA).** Os centros de Campinas e Ribeirão Preto atendem uma população maior que a da cidade porque incluem o atendimento de outras cidades próximas.

Os centros visitados realizam cerca de 4.500 exames por ano (**Figura 14**), sendo que os serviços públicos são responsáveis por aproximadamente 4000 exames/ ano. A **Tabela 17** descreve o tempo de atividade dos locais que realizam o TS e o tempo de uso dos equipamentos utilizados para a estimulação do suor.

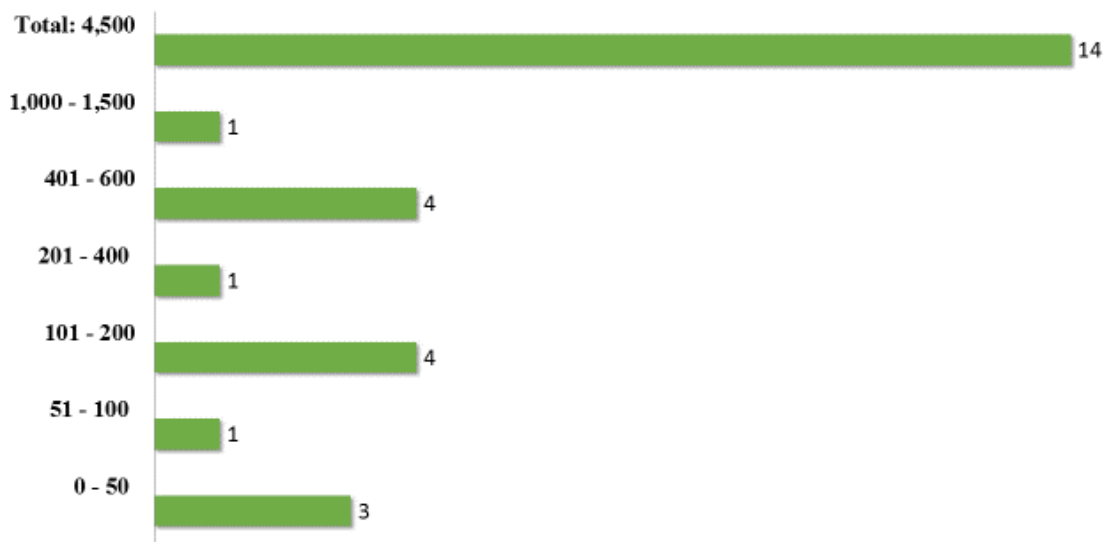


Figura 14: Quantidade de exames por ano por serviço. De 0 a 50 exames: dois serviços privados e 1 público; de 51 a 100: um privado; de 101 a 200: três públicos e um privado; de 200 a 400: um privado; e acima de 400 até 1500: todos públicos. Total = 4500 exames/ ano.

Tabela 17: Descrição do tempo de atividade dos locais que realizam o teste do suor e tempo de uso dos equipamentos.

Centros (número) *	Tempo de atividade do centro	Número de equipamentos	Tempo de uso
2	0 a 5 anos	11 (sendo 9 Macroduct®)	0 a 5 anos
0	5 a 10 anos	2	5 a 10 anos
2	10 a 15 anos	3	10 a 15 anos
6	15 a 20 anos	3	15 a 20 anos
2	Acima de 20 anos	2	Acima de 20 anos
12	-	21	-

* Foram incluídos apenas centros que realizam a estimulação com equipamento para a coleta do suor.

Quanto às fases do TS:

1) *Fase de estimulação*: em dois locais não havia estimulação; em três utilizavam equipamento e kit Macroduct® (EUA); em um CF-indicator® (EUA); em cinco Iontokit® (Brasil); e em um Qualitem® (Brasil). Estes equipamentos utilizavam bateria como fonte de energia. Os cinco equipamentos ligados à rede elétrica eram: três Iontokit®; um Ionto plus® (Brasil); e um de fabricação artesanal local. Estes equipamentos eram mais antigos, com tempo de uso médio de 15 anos (**Figuras 15 e 16-A**).

Todos os 12 serviços que faziam a estimulação, utilizavam o antebraço/ braço para a colocação do eletrodo, sendo que em um, os eletrodos eram colocados no pulso (nas faces ventral e dorsal) (**Figura 16**). Os outros locais eventuais de estimulação descritos em dois serviços diferentes foram coxa e tórax. Dois locais coletavam o suor sem fazer a estimulação. Em um, faziam a coleta no abdômen, com gaze recoberta por plástico e fixada com fita adesiva ou atadura, e recoberta por filme plástico envolto em todo o abdômen em um ambiente quente (carro no sol); em geral, o paciente também era envolvido em um cobertor (**Tabela 18**). No outro local, a coleta era realizada no pátio externo, com orientação de uso de roupa confortável, tipo agasalho com calça, casaco e tênis, sendo o abdômen envolto com filme plástico. Após correr no sol, era retirado o filme plástico do abdômen e com auxílio de uma colher descartável, coletado as gotas de suor que eram colocadas em tubo estéril, para posterior dosagem do Cl⁻ (**Figuras 17 e Figura 18-A**).

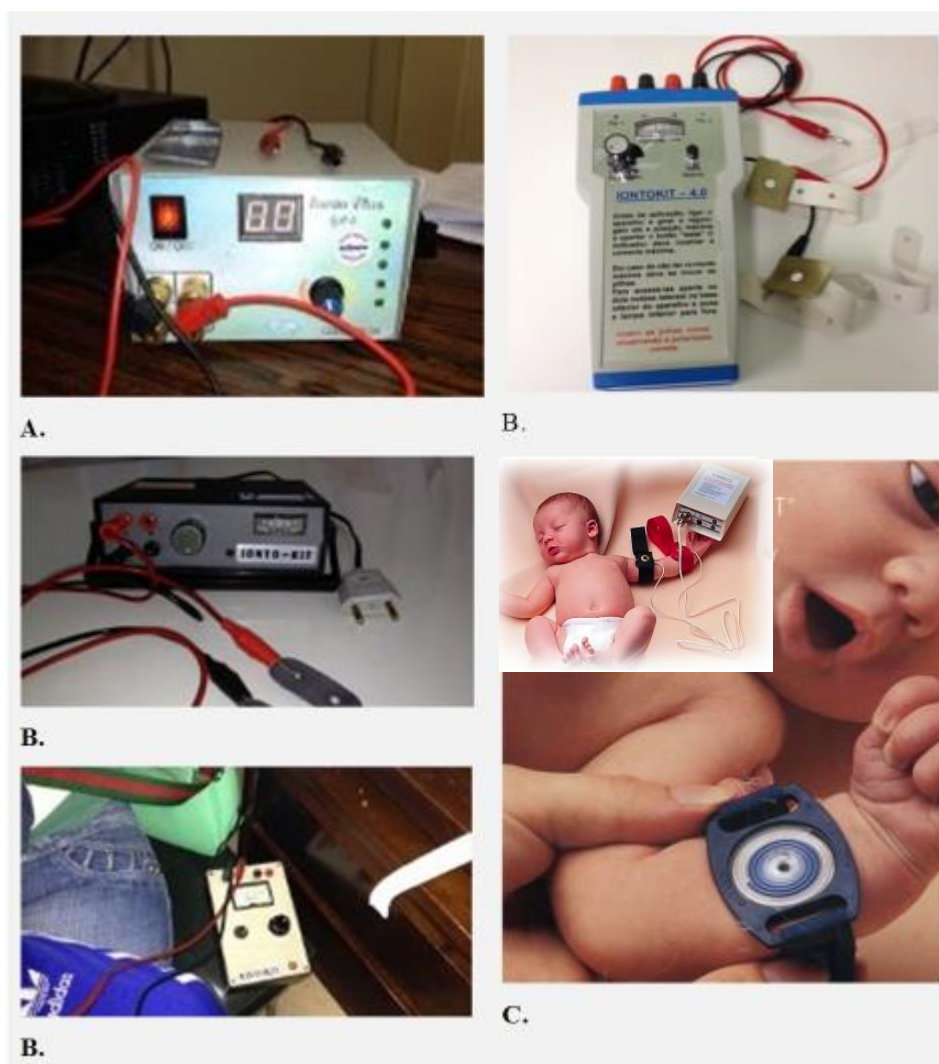


Figura 15: Equipamentos de Estimulação – aspectos práticos do teste do suor. Equipamentos de estimulação do suor (A) Ionto Plus[®] - Brasil. (B) Ionto-kit[®] - Brasil. (C) Macroduct[®] - USA.

Tabela 18. Métodos auxiliares utilizados na indução do suor e complicação por queimadura associada ao teste de suor.

Métodos auxiliares	Número de centros (n)
Casaco	6
Cobertor	6
Correr no sol	2
Caminhar	2
Filme plástico	2
Atadura	1
Parafilm	1
Queimadura*	Número de centros (%)
Sim	4 (28,57%)
Não	5 (35,71%)
Não sabe	3 (21,43%)
Não estimula	2 (14,29%)
Total	14

* a única complicação relatada para a realização do teste do suor foi o processo de queimadura.

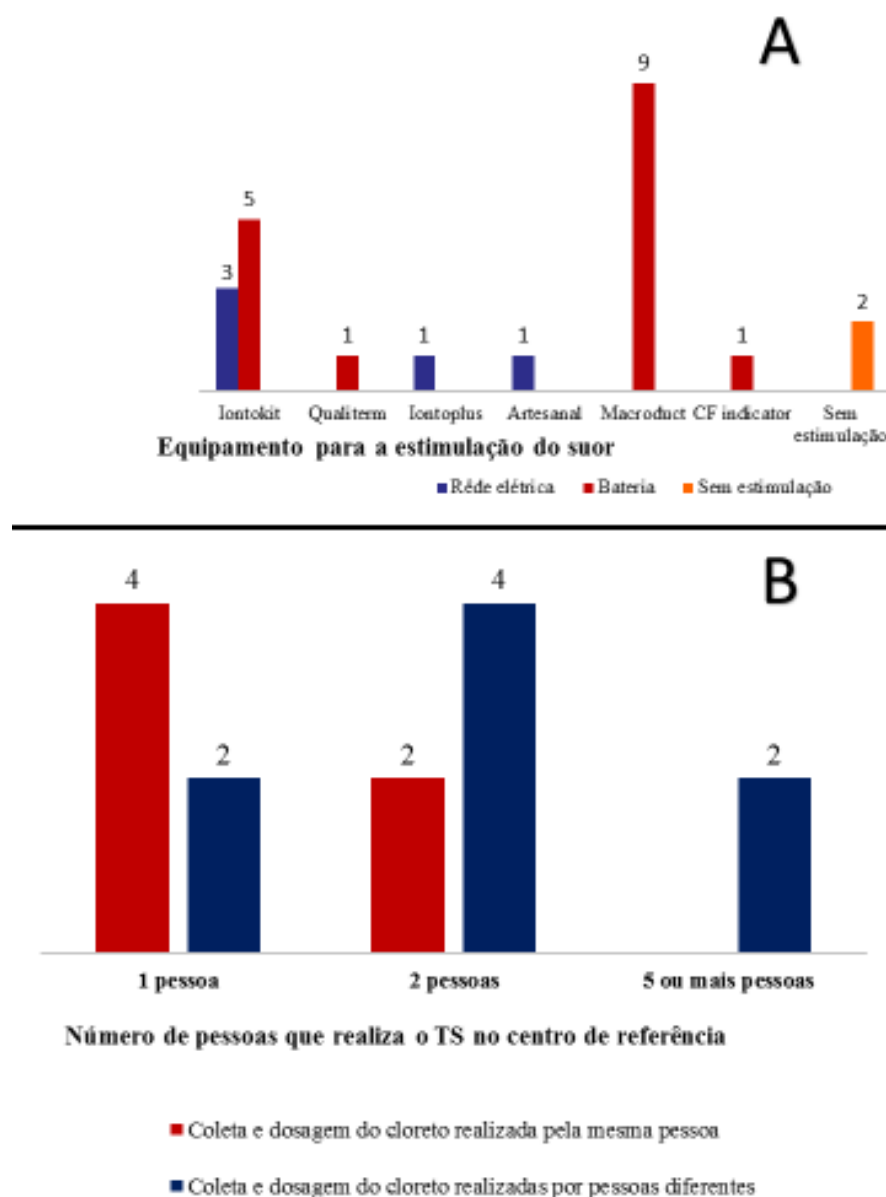


Figura 16. A. Equipamentos de estimulação quanto à fonte de energia. Presença de 21 equipamentos de estimulação em 12/14 locais visitados. Todos sem ANVISA e registro no país. Dois locais privados sem técnica e sem equipamento de estimulação da sudorese. **B. Quantidade de pessoas que realizam o TS quanto a coleta e dosagem do Cl⁻ nos serviços visitados.** Em seis serviços a equipe que coleta é responsável pela dosagem de Cl⁻. Em oito serviços a equipe que coleta não é a mesma que faz a dosagem do Cl⁻. Nestes locais, a equipe do laboratório é responsável pela dosagem do Cl⁻.

O tempo de estimulação variou de três a dez minutos (**Figura 18-B**). O tipo de corrente utilizada era conhecido em três locais (corrente contínua) e desconhecida em nove locais, dos quais cinco desconheciam a intensidade de corrente utilizada. Um local utilizava intensidade de corrente e 1,5 mA, dois de 3,0 mA e um de 4 a 6 mA. Os métodos auxiliares descritos para a estimulação da sudorese foram: casaco, cobertor, correr e caminhar no sol, filme plástico e

parafilme (**Tabela 18**). A queimadura foi a complicação observada em quatro serviços, nunca observada em cinco e desconhecida em dois (neste caso, as pessoas entrevistadas estavam trabalhando há pouco tempo no local) (**Tabela 18**).

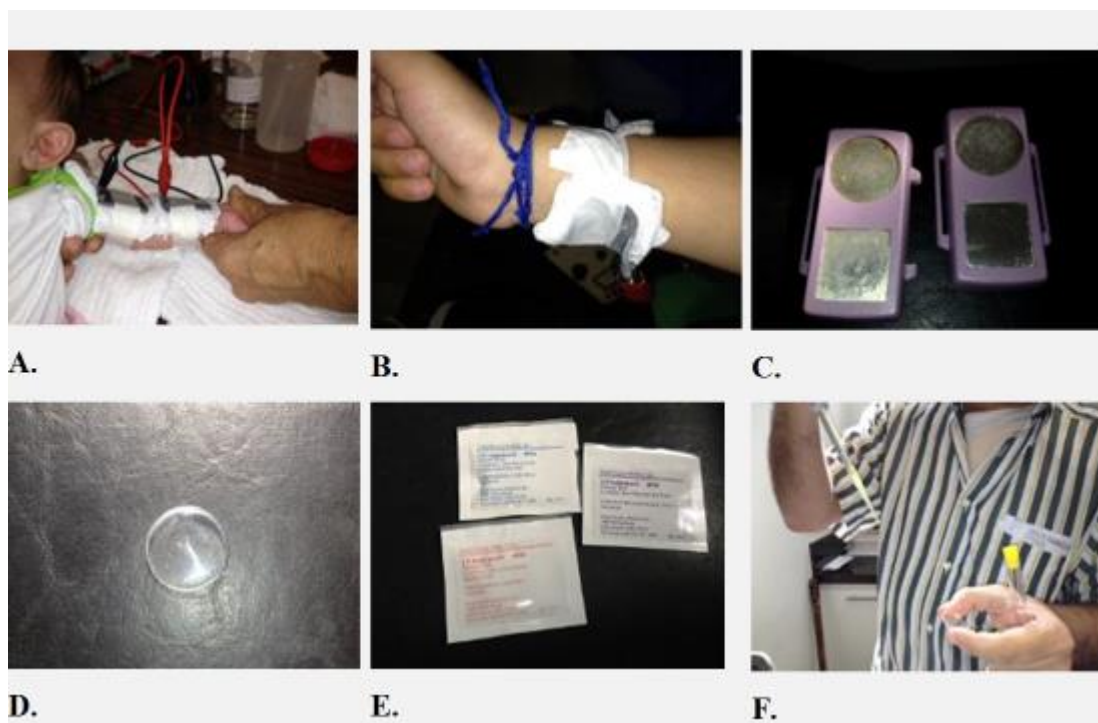


Figura 17. Técnica de estimulação e técnica exótica. (A) e (B) durante a estimulação. (C) CF indicator[®] (USA). (D) vidro de relógio. (E) kit de estimulação. (F) técnica adaptada.

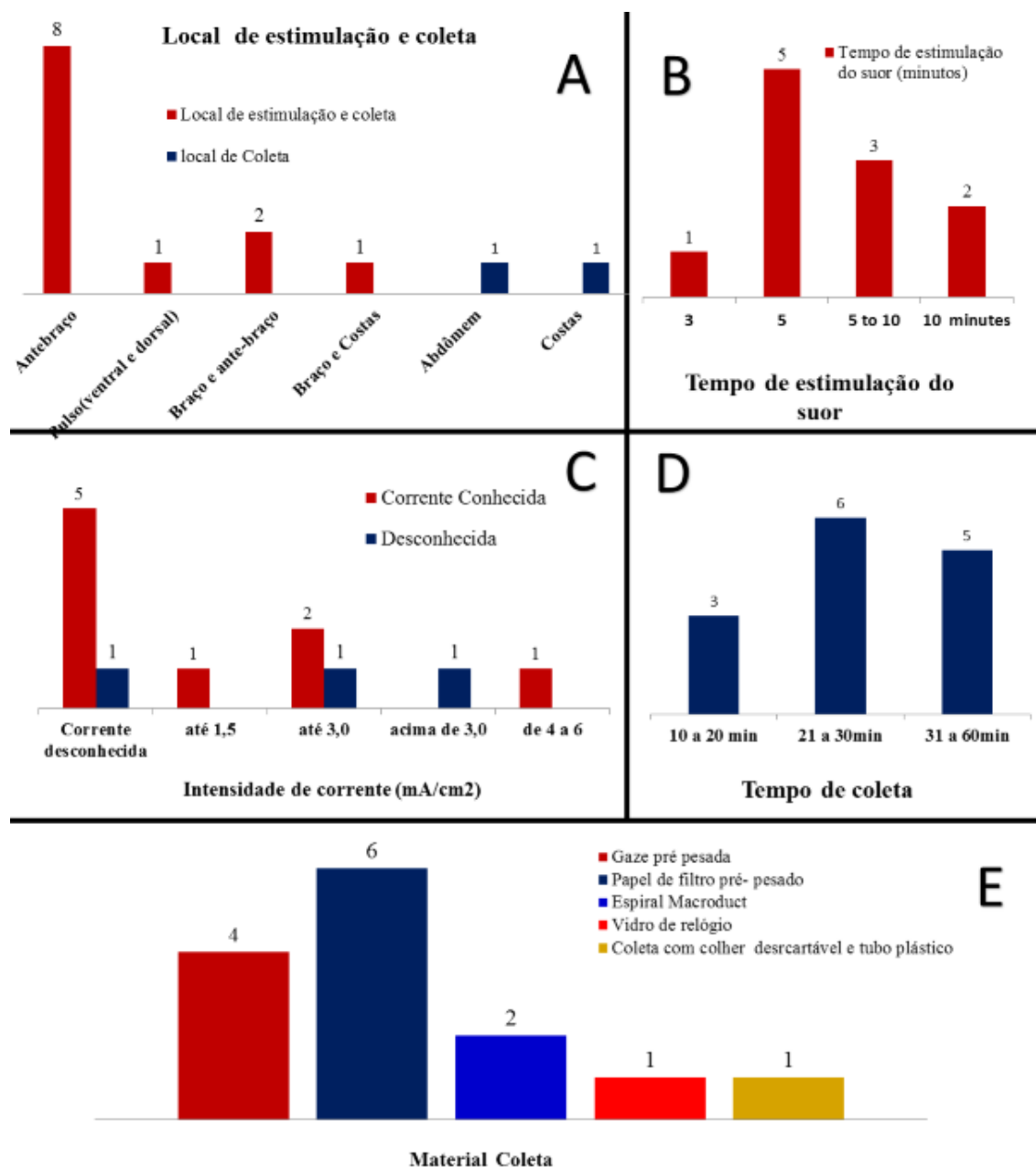


Figura 18: A. Localização da estimulação e coleta em 12 locais visitados que fazem a estimulação. São aceitos somente antebraço, braço e coxa para a estimulação e coleta pelas diretrizes da CFF (*CFF guidelines-2007*). **B. Tempo de estimulação da sudorese.** Em um local a estimulação elétrica é feita durante três min; em cinco locais durante 5 min; em três locais de cinco a 10 min; e em dois locais durante 10 min (*CFF guidelines-2007* determinam cinco min). **C. Conhecimento dos profissionais sobre o tipo e intensidade da corrente aplicadas.** Em nove locais onde o TS é realizado o tipo de corrente é desconhecida, em três é contínua e constante, em cinco a intensidade de corrente é desconhecida. As correntes conhecidas são (em mA/cm²): em um até 1,5; em três até 3; em um até 3,5; e em um de 4 a 6. **D. Tempo de coleta do suor em cada local avaliado.** Em três locais de 10 a 20 min de coleta; em seis, de 21 a 30 min; em cinco, de 31 a 60 min (*CFF guidelines-2007* determinam até 30 min). **E. Material de coleta.** Em quatro locais a coleta é com gaze, em seis papéis de filtro, em dois espirais Macroduct®; e em dois exóticos (1-vidro de relógio e 2-colher descartável e tubo plástico).

2) *Coleta e Pesagem*: O tempo de coleta variou de dez minutos à uma hora (**Figura 18-D**). O material de coleta utilizado foi adequado: gaze pré-pesada em três locais, papel de filtro pré-pesado em seis e espiral do Macroduct[®] em três (AACB, 2006; Mishra et al., 2005; LeGrys et al., 2007) (**Figura 18-E**). Em dois locais se utilizava técnica exótica: com um vidro de relógio que era colocado sobre o local da estimulação pela pilocarpina, fixado com fita adesiva e após a sudorese as gotículas de suor eram coletadas com pipeta estéril. (**Figuras 17 e 18-E**). Outro local utilizava tubo estéril e colher descartável (técnica já descrita). Um local não tinha balança adequada de precisão composta por 4 dígitos para a pesagem e nos dois que nem faziam a estimulação, esse item não foi considerado (NCCLS *guidelines*; C34-A3. Vol. 29 No.27).

3) *Dosagem do Cloro (Cl⁻)*: seis serviços utilizavam a técnica de titulometria manual e estavam operantes e seis utilizavam a técnica de coulometria (cloridrômetro), sendo que destes um estava inoperante. Dos nove serviços que tinham equipamento Macroduct[®], somente dois estavam em operação, sete sem funcionar porque um estava quebrado e seis sem insumos.

Quanto à formação dos integrantes da equipe, eles eram: médico (n=1), biomédico (n=4), biólogo (n=2), enfermeiro (n=4), técnico de enfermagem (n=5) e auxiliar de enfermagem (n=2). Em 11 centros visitados os profissionais tiveram treinamento interno com colegas do próprio serviço, em dois treinamentos externo ao seu serviço e em um treinamento externo e interno. Somente em um local havia conhecimento de *guidelines* internacionais e em um havia manual de procedimento operacional padrão (POP) impresso. Somente em quatro serviços havia conhecimento adequado pelo profissional que realiza o TS do número de testes necessários com resultados positivos ($Cl^- \geq 60$ mEq/L) para a confirmação da FC, e em sete sobre a quantidade mínima de suor aceitável para a realização de um TS confiável (**Figuras 19-A e B**) (NCCLS *guidelines*; LeGrys et al., 2007). Em seis serviços, a equipe que coleta é a mesma responsável pela dosagem de Cl⁻; nos oito restantes a equipe responsável pela dosagem de Cl⁻ era outra (era a equipe do laboratório); e em dois locais havia grande variedade da equipe de coleta do suor e dosagem do Cl⁻, com mais de cinco integrantes em cada uma (**Figura 16-B**).

A **Tabela 19** mostrou um resumo dos itens avaliados quando comparados às 23 diretrizes da *Cystic Fibrosis Foundation (CFF guidelines-2007; LeGrys et al., 2007)*.

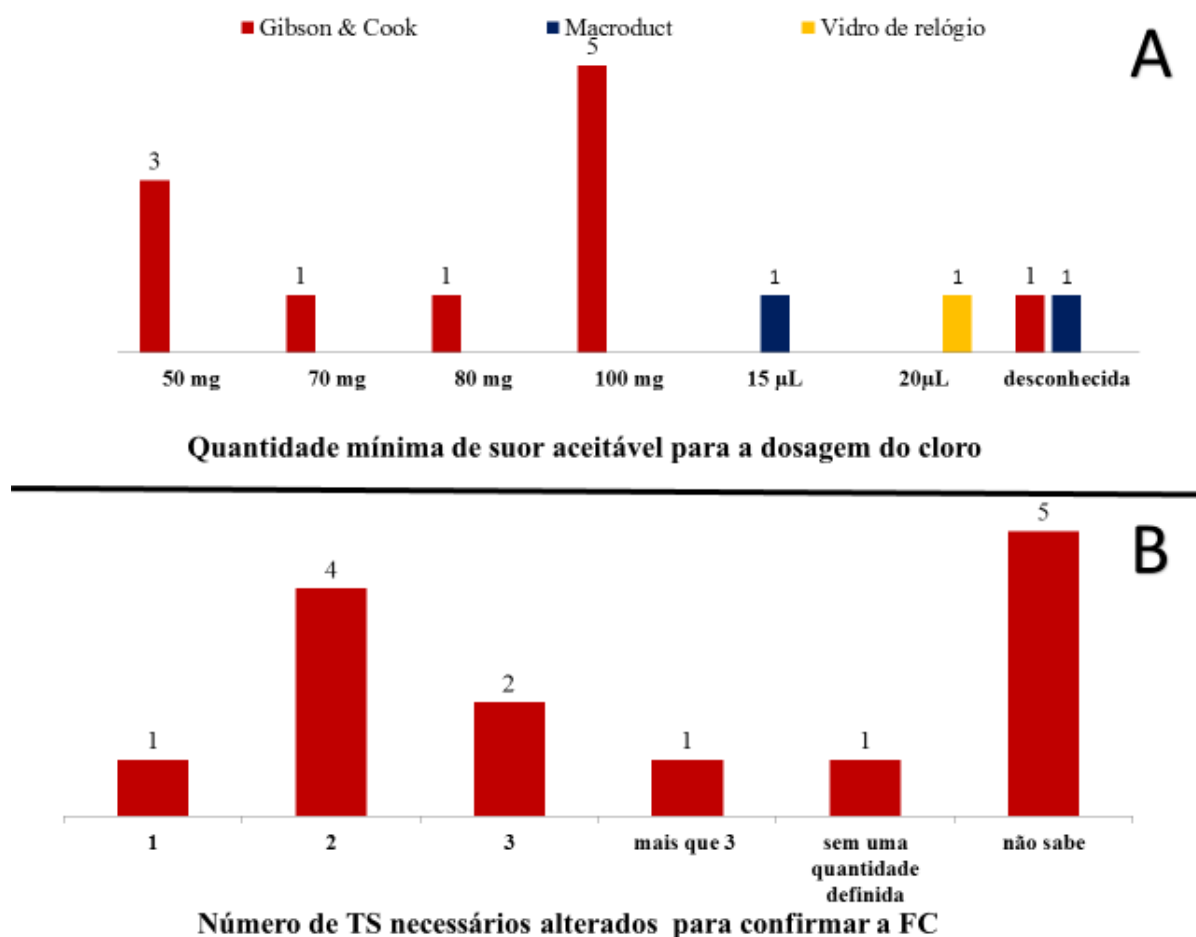


Figura 19. A. Conhecimento dos profissionais sobre a quantidade mínima aceitável de suor para a dosagem de Cl⁻. Em três locais = 50 mg; em um local = 70mg; em um local = 80mg; em cinco locais = 100mg; em um local = 15µL; em um local = 20µL; e em dois locais não sabiam qual era a quantidade mínima aceitável (*CFF guidelines-2007* determinam: 75 mg - técnica clássica e 15 µL - Macroduct®). **B. Conhecimento dos profissionais sobre a quantidade de exames alterados para a confirmação do diagnóstico de FC.** Em um local = um exame; em quatro locais = dois exames; em dois locais = três exames; em um local = mais que três exames; em um = quantos precisar; e em cinco não sabiam (*CFF guidelines-2007* determinam: mínimo de dois exames realizados em momentos diferentes).

Tabela 19. Resumo dos itens avaliados neste estudo em comparação às 23 diretrizes da *Cystic Fibrosis Foundation (CFF guidelines-2007)*.

Centros	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14
Serviço público														
Técnico gabaritado														
Orientação prévia														
TCLE														
Critério de exclusão														
Operacional														
Equipe de coleta pouco variada														
Treinamento externo														
Conhecimento guideline														
POP														
Adesão guideline														
Macroduct®														
outro equipamento bateria (não Macroduct®)														
Equipamento com rede elétrica														
Higienização da pele antes do teste														
Seca a pele														
Teste bilateral														
Material do eletrodo adequado (não chumbo)														
Conhecimento tipo de corrente														
Estimulação pilocarpina														
Conhecimento da sol. de pilocarpina /concentração														
Quantidade utilizada de pilocarpina padrão														
Sem estimulação														
Local de estimulação correto														
Ambiente climatizado														
Tempo estimulação 5 a 10														
Queimadura durante a estimulação														
Coleta com Macroduct®														
Coleta filtro de papel														
Coleta gaze														
Coleta alternativa														
Coleta com peso/volume do suor adequados														
Conhecimento quantidade de testes para o diagnóstico														

Precisão da balança igual ou maior de três dígitos														
Combinação de amostras ou ↑tempo coleta para completar volume suor														
Método auxiliar para aumentar o volume suor														
Análise apenas de Cl^-														
Análise de Na^+ e Cl^-														
Dosagem por titulometria														
Dosagem por caulimetria														
Dosagem condutividade														
Equipe diferentes de coleta e dosagem														
Armazenamento OK														
Tempo de armazenamento														
Programa de qualidade dosagem														
Manutenção do equipamento periódica														
Uso de controle de qualidade da amostra														
Utiliza dois ou mais controles de qualidade amostra														
Falha de coleta < 5% > 3m														
Análise apenas de amostras com pso adequados														
Conhecimento nº de testes necessários para diagnóstico														
Documentação de desempenho e envio de amostras a outros centros														
Revisão dos resultados pelo diretor do Centro														
Agendamento 2 X/ sem ou mais. Tempo inferior a 15 dias														
Centros	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14



Atende



Não atende



Sem dados



Não Procede

3.3.5 Discussão

No Brasil, o atendimento dos pacientes com FC é em sua grande maioria de responsabilidade do SUS (Sistema Único de Saúde) e está localizado em serviços públicos - estaduais, federais ou ligados a hospitais universitários (**Apêndice C: Suplemento 1 – Tabela III - Centros de referência de FC no Brasil**).

O estado de SP, com a maior renda *per capita* do país, conta com o maior número de centros de referência para tratamento de pacientes com FC no Brasil (n= 7). Todos são públicos e ligados a hospitais de ensino (**Apêndice C: Suplemento 1 – Tabela III - Centros de referência de FC no Brasil**). Alguns estados contam com dois centros; a maioria somente com um; e em alguns estados não existe nenhum centro de referência estruturado.

Neste estudo, verificamos que não existe uniformidade nas etapas para a realização do TS nos diferentes centros do estado de SP avaliados quando comparadas às 23 diretrizes descritas pela CFF (*CFF guidelines-2007*; LeGrys et al., 2007), e somente em dois há normatização escrita, e em um conhecimento de *guidelines* internacionais para a realização do TS. Em nenhum local é realizado controle de qualidade externa do teste como orientado pela CFF (*CFF guidelines-2007*; LeGrys et al., 2007). O único controle feito é dos equipamentos e reagentes utilizados para a dosagem do Cl^- . Todos os serviços públicos utilizam o método de estimulação pela pilocarpina e, na sua grande maioria, fazem a dosagem de Cl^- pelo método quantitativo de acordo com a literatura e com todas as diretrizes (*CFF guidelines-2007*; LeGrys et al., 2007; NCCLS *guidelines*; Collie et al., 2014). Por não dispor de equipamento adequado para estimulação para a realização da técnica de Gibson e Cooke e cloridrômetro para mínimos volumes, três serviços (dois públicos e um privado) utilizam a condutividade como método de diagnóstico. Dois serviços privados (2 de 5 locais privados visitados) não utilizavam método de estimulação, o que invalida o teste (NCCLS *guidelines*; C34-A3 2009); mesmo assim realizam cerca de 150 testes/ano. Um outro serviço privado utiliza técnica adaptada, exótica, sem nenhuma normatização para a realização do teste e equipamento de estimulação inadequado, não aprovado nos EUA pela FDA (teste *CF indicator*), sendo responsável por cerca de 200 exames/ano. Não existe no Brasil equipamento nacional ou importado com registro na ANVISA para estimulação do suor. Todos os equipamentos utilizados, incluindo os dos serviços em funcionamento há mais de 20 anos, utilizam equipamentos sem nenhuma regulamentação no país. O equipamento Macroduct®, embora descrito na portaria #288 do MS como adequado para a estimulação e coleta, não está licenciado e carece de registro no Brasil. Isto impossibilita a sua manutenção. Não há

quem faça de forma periódica a manutenção adequada dos equipamentos Macroduct® no país. Sete deles estão sem utilização devido à falta de insumos e/ ou quebra. Os kits comerciais são caros e de aquisição complexa, porque não há fornecimento de rotina pela empresa responsável pela importação do equipamento. A mesma portaria reconhece que o método de dosagem do Cl^- deve ser o quantitativo por coulometria ou titulometria manual, conforme descrito nas diretrizes da CFF (LeGrys et al., 2007). Os serviços privados apresentaram as maiores inconsistências para o TS (NCCLS *guidelines*; C34-A3 2009).

Por se tratar de uma doença crônica, de caráter progressivo, sem a possibilidade de uma terapêutica que promova a cura (Collie et al., 2014), com a necessidade de encaminhamento dos pacientes diagnosticados para tratamento para centros de referência e para a dispensação de medicamentos de alto custo (Ribeiro, Ribeiro & Ribeiro, 2002), o diagnóstico seguro se torna fundamental para a orientação e encaminhamentos adequados dos pacientes e seus familiares pela equipe médica.

Mesmo sabendo que o Brasil é um país de contrastes, e que nem sempre os resultados de uma região podem ser comparados aos de outras, pela diversidade étnica e social, este estudo mostrou parte da realidade que temos no Brasil.

É urgente a necessidade de equipamento de estimulação e dosagem de Cl^- no suor nacional ou importado, legalizado, que disponha de manutenção adequada e insumos com valores pertinentes e de dispensação ininterrupta (**Apêndice F – Suplemento 4 – Métodos Suplementares: Teste do Suor**).

Estamos em um momento ímpar onde celebramos a regulamentação da TNN para FC em todo o Brasil; porém, devemos estar dispostos a vencer os desafios que só podem ser suplantados quando são identificados e, em equipe, enfrentados. Acreditamos que podemos construir uma nova realidade, entendendo as limitações e dificuldades inerentes a cada serviço. Partindo deste estudo, pretendemos mostrar e discutir com os centros de referência no atendimento de FC do estado SP, normas e diretrizes para a realização do TS neste estado e a seguir em todo o Brasil.

Conclusão

No presente estudo não encontramos uniformidade nas etapas para a realização do TS nos diferentes centros avaliados do estado de SP. Foram encontradas limitações que podem inviabilizar o correto diagnóstico da FC. Deve-se buscar com urgência uma maneira de

padronizar o TS no Brasil, permitindo o diagnóstico seguro, que refletirá no melhor encaminhamento e cuidado dos pacientes com FC.

3.3.6 Referências

- AACB Sweat Testing Working Party; Coakley, J., Scott, S., Doery, J., Greaves, R., Talsma, P., Whitham, E., Winship, J. (2006). Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis: report from the AACB Sweat Testing Working Party. *Clin Biochem Rev.*, 27(2), S1-7.
- Cirilli N., Padoan R., Raia V. (2008). Audit of sweat testing: A first report from Italian cystic fibrosis centres. *Journal of Cystic Fibrosis*, 415-422.
- Clancy, J., Szczesniak, R., Ashlock, M., Ernst, S., Fan, L., Hornick, D., & Al., E. (2013). Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS One*, 8, e73905.
- Collie, J.T., Massie, R.J., Jones, O.A., LeGrys, V.A., Greaves, R.F. (2014). Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.*, 49(2), 106-17.
- Baumer, J.H. (2003). Evidence based guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. *Arch Dis Child.*, 88(12), 1126-7.
- Bombieri, C., Claustres, M., De Boeck, K., Derichs, N., Dodge, J., Girodon, E., ... Ferec, C. (2011). Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.*, 10 Suppl 2, S86-102.
- Gibson, L.E., Cooke, R.E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23, 545-9.
- Green, A., Kirk, J.; Guidelines Development Group. (2007). Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. Review. *Ann Clin Biochem.*, 44(Pt 1), 25-34.
- Hammond, K.B., Turcios, N.L., Gibson, L.E. (1994). Clinical evaluation of the Macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr.*, 124, 255-260.
- IBGE site: <http://www.ibge.gov> , consultado em 26 de julho de 2014.
- LeGrys, V.A. (1996). Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr.*, 129, 892-7.
- LeGrys, V.A., Yankaskas, J.R., Quittell, L.M., Marshall, B.C., Mogayzel, P.J. Jr. (2007). Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr.*, 151(1), 85-9.

- Lezana, J.L., Vargas, M.H., Karam-Bechara, J., Aldana, R.S., Furuya, M.E. (2003). Sweat conductivity and chloride titration for cystic fibrosis diagnosis in 3834 subjects. *J Cyst Fibros.*, 2, 1–7.
- NCCLS. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline. Second edition, US National Committee for Clinical Laboratory Standards Document C34-A2 (ISBN 1-556238-40704) 2000. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Waynes, Pennsylvania 19087 0 1894, USA.
- <http://www.azdhs.gov/lab/aznewborn/documents/home/CLSI-C34-A3.pdf>
- Manual de normas técnicas do Ministério da Saúde, 2004. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – 2. ed. ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.
- http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal.pdf
- Marson F.A., Bertuzzo C.S., Ribeiro M.Â., Ribeiro A.F., Ribeiro J.D. (2013). Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.*, 39(3), 306-16
- Mishra, A., Greaves, R., Massie, J. (2005). The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev*, 26, 135–53.
- Mishra, A., Greaves, R., Massie, J. (2007). The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. *Clin Biochem Rev.*, 28(2), 60–76.
- Mastella, G., Di Cesare, G., Borruso, A., Menin, L., Zanolla, L. (2000). Reliability of sweat-testing by the Macroduct® collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson and Cooke technique. *Acta Paediatrica.*, 89(8), 933-7
- Schales, O. & Schales, S.S. (1941). Chloride in biological fluids for the determination of a simple and accurate method. *J. Biol. Chem.*, 140:879-884.
- Sousa, M., Servidoni, M. F., Vinagre, A. M., Ramalho, A. S., Bonadia, L. C., Felício, V., ... Amaral, M. D. (2012). Measurements of CFTR-Mediated Cl(-) Secretion in Human Rectal Biopsies Constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis. *PloS One*, 7(10), e47708.
- Suarez-Kurtz G. (2005). Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci .*, 26(4), 196-201.
- Portaria 288, MS- Diário Oficial de União - Número 56 de 22 de Março de 2013, página 47-8. <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=22/03/2013>
- Quinton, P.M. (2007). Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology*, 22, 212–25.

- Quinton, P., Molyneux, L., Ip, W., Dupuis, A., Avolio, J., Tullis, E., ... Gonska, T. (2012) β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 186(8), 732-9.
- Ribeiro J.D., Ribeiro M.A., Ribeiro A.F. (2002).Controversies in cystic fibrosis--from pediatrician to specialist.*J Pediatr (Rio J)*, 78 Suppl 2, S171-86.
- Webster, H.L. (1983). Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 18(4), 313-38.

4. DISCUSSÃO & CONCLUSÃO

O acometimento pulmonar devido à atividade da CFTR deficiente ou ausente é o que determina a piora clínica do paciente e a sua sobrevida. O fenótipo clássico da FC é mais facilmente reconhecido do que o não clássico, sendo em sua grande maioria diagnosticado ainda nos primeiros anos de vida, sugerido por um ou mais sintomas clínicos característicos e/ ou pelo antecedente familiar de um irmão ou parente próximo ou, mais recentemente, em nosso meio, pela TNN positiva para a FC. Tal diagnóstico deve ser confirmado pela presença de evidência da disfunção da CFTR por meio da identificação de duas mutações que sabidamente causam FC, dois testes de suor alterados e / ou medidas bioelétricas anormais da atividade da CFTR. No entanto, existe uma parcela de pacientes sendo diagnosticados desde a infância até à idade adulta que apresentam as formas não clássicas ou mais leves da doença, e que, dependendo da origem étnica das populações avaliadas, podem representar até 15% de todos os diagnósticos de FC. Para confirmar ou excluir o diagnóstico de FC em indivíduos com critérios de diagnóstico questionável ou TNN alterada para FC, sem evidência de manifestação clínica da doença, é necessário a aplicação de métodos de avaliação da função da CFTR confiáveis e validados.

O objetivo do **primeiro trabalho** aqui apresentado foi o de estabelecer um biomarcador sensível e robusto para o diagnóstico e prognóstico FC através da avaliação eletrofisiológica de fragmentos de biópsia retal em micro-câmaras de *Ussing*. Foram avaliadas as medidas da secreção de Cl^- mediada pela via AMPc (representando a função da CFTR) em 524 biópsias retais recém retiradas de 118 indivíduos, sendo eles 51 indivíduos com FC (pacientes com diagnóstico clínico confirmado); 49 com suspeita clínica de FC; e 18 indivíduos controle saudáveis pareados por idade. Nossos resultados mostraram que os indivíduos com a FC clássica apresentaram o início dos sintomas mais precoce, com a presença de insuficiência pancreática, doença pulmonar grave e falta da secreção de Cl^- mediada pela CFTR com valores $\leq 5\%$ da função quando comparada aos indivíduos saudáveis. Os indivíduos com formas não clássicas da FC apresentaram função residual de Cl^- mediada pela CFTR entre 10-57%, e os controles não FC apresentaram valores mais elevados $\geq 30\text{-}35\%$. A comparação destes valores permitiu confirmar FC em 16/49 indivíduos (33%) e excluí-la em 28/49 (57%). Além disso, estes dados evidenciaram boas correlações com diversos parâmetros clínicos, tais como: a idade ao diagnóstico, concentrações de Cl^- no suor, função pancreática (valores de elastase fecal), escores de SK e função pulmonar (FEV_1). Portanto, a determinação da secreção de Cl^- mediada pela CFTR em biópsias retais mostrou aqui ser um biomarcador preditivo sensível, reproduzível e robusto para o diagnóstico e prognóstico da FC.

A partir deste dados atuais, podemos propor que os níveis de CFTR acima ~ 10% da função CFTR normal, são necessários para um melhor prognóstico FC. Os pacientes com FC com função da CFTR abaixo de 10% apresentaram quadro clínico mais grave. Além disso, os controles não FC e indivíduos cujo diagnóstico de FC foi afastado tiveram níveis de secreção de Cl^- mediado pela CFTR $\geq 30\text{-}35\%$, como também demonstrado em estudos anteriores (Hirtz et al., 2004). Os resultados da avaliação genética trouxeram uma nova proposta de pesquisa de mutações na região de Campinas, que provavelmente se reflectem para o estado de SP, iniciando com a pesquisa em 15 exões (exões 3, 6a, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17b, 18, 19, 20, 21 and 24), a qual mostrou uma frequência de detecção de mutações de 95,14%; e quando necessário alargando depois a pesquisa de mutações para os restantes 12 exões.

No **segundo trabalho** foram avaliados (i) a técnica utilizada para a realização das biópsias quanto à viabilidade das amostras obtidas para análise em micro-câmara de *Ussing* e análise bioquímica; (ii) avaliação global do procedimento da biópsia retal quanto ao tipo de preparo e sedação e presença de complicações; e também quanto ao grau de desconforto a partir da perspectiva dos pacientes.

Em relação à viabilidade das biópsias, foram comparadas as medidas de resistência transepitelial utilizando-se três soluções diferentes para a preparação do intestino (solução fisiológica de NaCl a 0,9%, solução de glicerina 12%, ambas por via retal, e manitol a 10% por via oral), e duas pinças de biópsia (padrão e jumbo). Correlações semelhantes foram realizadas para os descritores macroscópicos das biópsias, nomeadamente: nível de integridade dos tecidos, friabilidade, presença de muco e sangue nas amostras. Os nossos resultados indicam que o aumento da integridade dos tecidos e a menor friabilidade dos espécimes obtidos se correlacionam com uma maior resistência transepitelial (isto é, viabilidade), e que dependem da solução utilizada para a preparação do intestino e da pinça de biópsia. A solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e a pinça jumbo foram as que demonstraram melhores resultados no estudo.

Em relação ao conforto do procedimento da biópsia retal, a grande maioria dos indivíduos (76%) não relataram altos níveis de desconforto, devido a curta duração do procedimento (máximo de 15 min.) e por este ser relativamente indolor (79%).

Durante a realização do projeto do estudo com as biópsias retais encontramos alguns pacientes com valores questionáveis do TS, outros com a necessidade de realizar um segundo TS, porque tinham somente um e, durante esse período, ocorreu a implantação da TNN para FC no

estado de SP. Houve um aumento na demanda local e uma necessidade de observar a dinâmica de realização do TS em nosso centro. Por isso, iniciamos um processo de revisão da técnica de realização do TS que culminou com o **terceiro trabalho** desta tese, que tem como objetivo a avaliação das etapas da realização do teste do suor em serviços capacitados para o diagnóstico de FC no estado de SP.

As dificuldades quanto a realização do TS eram compartilhadas e, após um encontro dos centros de referência que atendem os pacientes com FC no estado de SP, foi realizado o convite de participação aos centros deste estado. Nossos resultados mostram não haver uniformidade nas etapas para a realização do TS nos diferentes centros do estado de SP avaliados no estudo. Foram encontradas inconsistências quanto à padronização da técnica e disponibilidade de equipamentos, situação que pode inviabilizar o correto diagnóstico da FC em todo o país, já que acreditamos que este estudo possa ser o reflexo do que ocorre no Brasil. É urgente a padronização da técnica do TS a partir de uma revisão conjunta com todos os centros capacitados que realizam o TS no Brasil.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS & PERSPECTIVAS

A partir da concordância dos outros centros de referência de FC em SP e em outros estados do Brasil, associado à colaboração do Prof. Vieira Jr. do IFSP e financiamento CNPq, teremos a participação de vários centros no Brasil em um projeto para a validação de um novo dispositivo nacional para a estimulação do suor e padronização da técnica de realização do TS no Brasil, com treinamento e capacitação do pessoal envolvido com a realização dos testes.

Com a vinda da Prof. Gonska do Canadá (Sick Kids - Toronto) em Fevereiro de 2014, hoje já estudamos a função da CFTR na glândula sudorípara com o evaporímetro - método mais acessível e mais barato que a realização de biópsias retais, cujos resultados estão sendo avaliados. Como todos os métodos que estudam a eletrofisiologia da CFTR, deve respeitar padronização rígida e ainda dispõe de aplicação limitada a poucos centros no mundo, e o nosso é um deles.

Com a vinda da Prof. Sousa (Universidade Nova de Lisboa - Portugal), estamos comparando os métodos de avaliação bioelétrica da função da CFTR na biópsia retal e na glândula sudorípara, de forma a acurar os diferentes níveis de actividade da CFTR nos diferentes tecidos e pelas diferentes técnicas. Esperamos indicar a melhor combinação de ferramentas diagnósticas para a FC.

Através do Projeto Ciências sem Fronteiras (CAPES- Brasil) com a Universidade de Lisboa (Portugal), na pessoa da Prof. Amaral, realizamos visita aos centros de referência de outros estados, com o objetivo de colaborar e disponibilizar a todos os outros centros as técnicas diagnósticas aqui já disponíveis, compartilhando conhecimento e acrescentando experiência. Com esta colaboração, pretendemos implantar num futuro próximo a técnica dos organóides nas biópsias retais e da cultura do escovado da mucosa nasal, o que irá otimizar e simplificar para o paciente com FC, a pesquisa da função da CFTR nas câmaras de *Ussing*. Permitirá, de certa forma, imortalizar as células de cada paciente com FC, proporcionando um conhecimento individual do grau de atividade de cada um deles e também o estudo da ação de novos compostos para a modulação da proteína CFTR *ex vivo*, de forma individualizada.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

- AACB Sweat Testing Working Party; Coakley, J., Scott, S., Doery, J., Greaves, R., Talsma, P., Whitham, E., Winship, J. (2006). Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis: report from the AACB Sweat Testing Working Party. *Clin Biochem Rev.*, 27(2), S1-7.
- Andersen, D. H. (1938). Cystic Fibrosis of the pancreas and its relations to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child.*, (56), 344–399.
- Andersen, D. H., & Hodges, R. G. (1946). Celiac syndrome: genetics of Cystic Fibrosis of the pancreas with consideration of etiology. *Am. J. Dis. Child.*, (72), 62–70.
- Amaral, M.D., Kunzelmann, K.(2007). Molecular Targeting of CFTR as a Therapeutic Approach to Cystic Fibrosis. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 334-41.
- Audrézet, M.P., Costes, B., Ghanem, N., Fanen, P., Verlingue, C., Morin, J.F., Mercier, B., Goossens, M. & Férec, C. (1993). Screening for cystic fibrosis in dried blood spots of newborns. *Mol Cell Probes*. 7(6):497-502
- Baumer, J.H. (2003). Evidence based guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. *Arch Dis Child.*, 88(12), 1126-7.
- Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeeasingh, M., & Riordan, J. R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, 68(4), 809–818.
- Beauchamp, M., & Lands, L. (2005). Sweat-testing: a review of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol.*, 39, 507–11.
- Behm, J.K., Hagiwara, G., Lewiston, N.J., Quinton, P.M., Wine, J.J. (1987) Hyposecretion of B2adrenergically induced sweating in CF heterozygotes. *Pediatr Res*, 22, 271–276.
- Berschneider, H.M., Knowles, M.R., Azizkhan, R.G., Boucher, R.C., Tobey, N.A., Orlando, R.C., Powell, D.W. (1998). Altered intestinal chloride transport in cystic fibrosis. *FASEB J*, 2, 2625–9.
- Blackman, S.M, Deering-Brose, R., McWilliams, R., Naughton, K., Coleman, B., Lai, T, ... Cutting, G.R. (2006). Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in Cystic Fibrosis. *Gastroenterology.*, 131(4), 1030-9.
- Bonadia, L., de Lima Marson, F., Ribeiro, J., Paschoal, I., Pereira, M., Ribeiro, A., & Bertuzzo, C. (2014). CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene*, 540(2), 183–90.
- Bombieri, C., Claustres, M., De Boeck, K., Derichs, N., Dodge, J., Girodon, E., ... Férec, C. (2011). Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.*, 10 Suppl 2, S86-102.
- Boucher, R. C., Stutts, M. J., Knowles, M. R., Cantley, L., & Gatzky, J. T. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*, 78, 1245–1252.

- Cabello, G.M.K., Roig, S.R.S., Fonseca, A., Carvalho, E.C.D., Fernandes, O. (2003). Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação delta F508. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, (39)1, 15-20.
- Cirilli N., Padoan R., Raia V. (2008). Audito of sweat testing: A first report from Italian cistic fibrosis centres. *Journal of Cystic Fibrosis*, 415-422.
- Clancy, J., & Jain, M. (2012). Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *AmJRespir Crit Care Med*, 186, 593–7.
- Clancy, J. P. (2010). Diagnosing cystic fibrosis in patients with non-diagnostic results: the case for intestinal current measurements. *Thorax*, 65(7), 575–6.
- Clancy, J., Szczesniak, R., Ashlock, M., Ernst, S., Fan, L., Hornick, D. & Al, E. (2013). Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS One*, 8, e73905.
- Collie, J.T., Massie, R.J., Jones, O.A., LeGrys, V.A., Greaves, R.F. (2014). Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.*, 49(2), 106-17.
- Colin, A.A., Wohl, M.E. (2014). Cystic fibrosis. *Pediatr Rev.*, 15(5):192-200.
- Crawford, I., Maloney, P.C., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Hyde, S.C., Turley, H., ... Higgins, C.F. (1991). Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(20):9262-6.
- Crossley, J., Elliott, R., & Smith, P. (1979). Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*, 1(8114), 472–474.
- Crudy, C., Kalia, Y. N., Yogeshvar, N., & Guy, R. H. (2001). Non-invasive assessment of the effects of iontophoresis on human skin in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 769–777.
- Coutinho, C.A., Marson, F.A., Ribeiro, A.F., Ribeiro, J.D., Bertuzzo, C.S. (2013) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.*, 39(5), 555-61.
- Cutting, G.R. (2010). Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann NY Acad Sci*, 1214, 57-69.
- Davis, P., Shelhamer, J., & Kaliner, M. (1980). Abnormal adrenergic and cholinergic sensitivity in cystic fibrosis. *N Engl J Med.*, 302(26), 1453–6.
- Dekkers, J.F., Wiegerinck, C.L., de Jonge, H.R., Bronsveld, I., Janssens, H.M., de Winter-de Groot, K.M., ... Beekman, J.M. (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med.*, 19(7):939-45.

- De Jonge, H. R., Ballmann, M., Veeze, H., Bronsveld, I., Stanke, F., Tummeler, B., & Sinaasappel, M. (2004). Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 159–163.
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M.A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., ... Girodon, E. (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders-updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.*, 17(1):51-65.
- Derichs, N., Sanz, J., Von Kanel, T., Stolpe, C., Zapf, A., Tümmler, B., ... Ballmann, M. (2010). Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*, 65(7), 594–9.
- Di Sant’Agnese, P. A., Darling, R. C., Perera, G. A., & Shea, E. (1953). Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*, (12), 549–563.
- Di Sant’Agnese, P., & Powell, G. (1962). The eccrine sweat defect in cystic fibrosis of the pancreas. *Ann NY Acad Sci*, 93, 555–599.
- Dicke, W., Weijers, H., & van de Kamer, J. (1953). Coeliac disease. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr Scand*, 42, 34–42.
- Drumm, M. L., Pope, H. A., Cliff, W. H., Rommens, J. M., Marvin, S. A., Tsui, L. C., ... Wilson, J. M. (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell.*, 62(6), 1227–1233.
- Farber, S. (1943). Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *N. Engl. J. Med.*, (229), 653–682.
- Farrell, P., & Kosciak, R. (1996). Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics*, 97, 524–528.
- Farrell, P.M., Rosenstein, B.J., White, T.B., Accurso, F.J., Castellani, C., Cutting, G.R., ... Campbell III, P. W. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.*, 153, S4-14.
- Frizzell, R. A., Rechkemmer, G., & Shoemaker, R. L. (1986). Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science*, 233, 558–560.
- Gahm, N., & Shwachman, H. (1956). Studies in cystic fibrosis. Simple test for detection of excessive chloride on the skin. *N Eng J Med*, 255(21), 999–1001.
- genet.sickkids.on.ca/
- Gibson, L., & Cooke, R. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23(3), 545–9.
- Goldstein, J., Nash, N., Al-Bazzaz, F., Layden, T., & Rao, M. (1988). Rectum has abnormal ion transport but normal cAMP-binding proteins in cystic fibrosis. *Am J Physiol*, 254, C719–24.

- Gonska, T., Ip, W., Turner, D., Han, W.S., Rose, J., Durie, P., Quinton, P. (2009). Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax*, 64(11), 932-8.
- Green, A., Kirk, J., Guidelines Development Group. (2007). Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem.*, 44, 25–34.
- Grosse, S.D., Boyle, C.A., Botkin, J.R., Comeau, A.M., Kharrazi, M., Rosenfeld, M. & Wilfond, B.S. (2004). Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *CDC MMWR Recomm Rep.* 53(RR-13):1-36. Review
- Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK; 2003. <http://www.acb.org.uk/>.
- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., Lukacs, G.L. (1999). C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. *J Biol Chem.*, 274(31), 21873-7.
- Hammond, K.B., Turcios, N.L., Gibson, L.E. (1994). Clinical evaluation of the Macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr.*, 124, 255-260.
- Hardcastle, J., Hardcastle, P.T., Taylor, C.J., Goldhill, J. (1991). Failure of cholinergic stimulation to induce a secretory response from the rectal mucosa in cystic fibrosis. *Gut*, 32, 1035–9.
- Hirtz, S., Gonska, T., Seydewitz, H. H., Thomas, J., Greiner, P., Kuehr, J., ... Mall, M. (2004). CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology.*, 127(4), 1085–1095.
- Hofmann, T., Senier, I., Bittner, P., Hüls, G., Schwandt, H.J. & Lindemann, H. (1997). Aerosolized amiloride: dose effect on nasal bioelectric properties, pharmacokinetics, and effect on sputum expectoration in patients with cystic fibrosis. *J Aerosol Med*, 10(2):147-58.
- Hug, M. J., Derichs, N., Bronsveld, I., & Clancy, J. P. (2011). Measurement of ion transport function in rectal biopsies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 741, 87–107.
- Ikpa, P., Bijvelds, M., & de Jonge, H. (2014). Cystic fibrosis: Toward personalized therapies. *Int J Biochem Cell Biol.*, 52C, 192–200.
- Kerem, B., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., ... Tsui, L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245, 1073–1080.
- Knowles, M., Gatzky, J., & Boucher, R. (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 305(25), 1489–95.
- Knowles, M.R., Stutts, M.J., Spock, A., Fisher, N., Gatzky, J.T., Boucher, R.C. (1983). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*, 221, 1067-70.

- Knowles, M.R., Olivier, K.N., Hohneker, K.W., Robinson, J., Bennett, W.D. & Boucher, R.C. (1995). Pharmacologic treatment of abnormal ion transport in the airway epithelium in cystic fibrosis. *Chest*, 107(2 Suppl):71S-76S. Review.
- Knowles, M.R., Durie, P.R. (2002). What is cystic fibrosis? *N Engl J Med*, 347, 439–442.
- Knowlton, R., Cohen-Hagenhauer, O., Van Cong, N., Frezal, J., Brown, V., Barker, D., ... Al., E. (1985). A polymorphic DNA marker inked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*, 318, 681–693.
- Landsteiner, K. (1905). Intestinal obstruction from thickened meconium. *Zentralbl Allg Pathol*, 16, 903–907.
- LeGrys, V.A. (1996). Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr.*, 129, 892-7.
- LeGrys, V.A., Yankaskas, J.R., Quittell, L.M., Marshall, B.C., Mogayzel, P.J. Jr. (2007). Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr.*, 151(1), 85-9.
- Lezana, J.L., Vargas, M.H., Karam-Bechara, J., Aldana, R.S., Furuya, M.E. (2003). Sweat conductivity and chloride titration for cystic fibrosis diagnosis in 3834 subjects. *J Cyst Fibros.*, 2, 1–7.
- Littlewood, J.M., Wolfe, S.P., Conway, S.P. (2006). Diagnosis and treatment of intestinal malabsorption in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.*, 41(1), 35-49.
- Liu, X., Ory, V., Chapman, S., Yuan, H., Albanese, C., Kallakury, B., ... Schlegel, R. (2012). ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol.*, 180:599–607.
- Losty, H.C., Wheatley, H., Doull, I. (2006). The evaluation of a novel conductometric device for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem.*, 43, 375–81.
- Mall, M., Greger, R., Seydewitz, H., Kuehr, J., Brandis, M., & Kunzelmann, K. (1998a). Detection of defective cholinergic Cl⁻ secretion in human rectal biopsies for the diagnosis of Cystic Fibrosis. *J Clin Invest*, 102, 15–21.
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. (1998b). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest.*, 102(1):15-21.
- Mall, M., Hirtz, S., Gonska, T., & Kunzelmann, K. (2004). Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 165–169.
- Mall, M., Kreda, S. M., Mengos, A., Jensen, T. J., Hirtz, S., Seydewitz, H. H., ... Boucher, R. C. (2004). The DF508 Mutation Results in Loss of CFTR Function and Mature Protein in Native Human Colon. *Gastroenterology*, 126, 32– 41.
- Manual de normas técnicas do Ministério da Saúde, 2004. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal / Ministério da Saúde, Secretaria de

Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – 2. ed. ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal.pdf

- Marson, F., Bertuzzo, C., Hortencio, T., Ribeiro, J., Bonadia, L., & Ribeiro, A. (2012). The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.*, 12, 41.
- Marson, F.A., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, M.Â., Ribeiro, A.F., Ribeiro, J.D. (2013). Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.*, 39(3), 306-16
- Marson, F.A., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, A.F., Ribeiro, J.D. (2014). Polymorphisms in the glutathione pathway modulate cystic fibrosis severity: a cross-sectional study. *BMC Med Genet.*, 4, 15:27.
- Mastella, G., Di Cesare, G., Borruso, A., Menin, L., Zanolla, L. (2000). Reliability of sweat-testing by the Macroduct® collection method combined with conductivity analysis in comparison with the classic Gibson and Cooke technique. *Acta Paediatrica.*, 89(8), 933-7
- May, C., & Lowe, C. (1949). Fibrosis of the pancreas in infants and children; an illustrated review of certain clinical features with special emphasis on the pulmonary and cardiac aspects. *J Pediatr.*, 34(6), 663–87.
- Mekus, F., Ballmann, M., Bronsveld, I., Bijiman, J., Tummler, B. (2000). Categories of $\Delta F508$ homozygous Cystic Fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotype characteristics. *Twin Res.*, 3(4), 277-93.
- Mendes, F., Doucet, L., Hinzpeter, A., Ferec, C., Lipecka, J., Fritsch, J., ... Amaral, M. D. (2004). Immunohistochemistry of CFTR in native tissues and primary epithelial cell cultures. *J.Cyst.Fibros.*, 3 Suppl 2:, 37–41.
- Misch, K., & Holden, H. (1958). Sweat test for diagnosis of fibrocystic disease of the pancreas. *Arch Dis Child*, 33, 179–180.
- Mishra, A., Greaves, R., & Massie, J. (2005). The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin.Biochem.Rev.*, 26(4), 135–153.
- Mishra, A., Greaves, R., Massie, J. (2007). The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. *Clin Biochem Rev.*, 28(2), 60–76
- Moskowitz, S.M., Chmiel, J.F., Stern, D.L., Cheng, E., Gibson, R.L., Marshall, S.G., Cutting, G.R. (2008). Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med.*, 10(12), 851-68.
- NCCLS. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline. Second edition, US National Committee for Clinical Laboratory Standards Document C34-A2 (ISBN 1-556238-40704) 2000. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 0 1894, USA.

<http://www.azdhs.gov/lab/aznewborn/documents/home/CLSI-C34-A3.pdf>

- Neusser, A., Schauf, G., & Hölzle, E. (1993). Iontophoresis with alternating current and direct current offset (AC/DC iontophoresis): a new approach for the treatment of hyperhidrosis. *British Journal of Dermatology*, 129(2), 166–169.
- Nousia-Arvanitakis, S. (1999). Cystic fibrosis and the pancreas: recent scientific advances. *J Clin Gastroenterol.*, 29(2), 138-42.
- Nuutinen, J., Alanen, E., Autio, P., Lahtinen, M.R., Harvima, I., Lahtinen, T. (2003). A closed unventilated chamber for the measurement of transepidermal water loss. *Skin Res Technol*, 9, 85–89.
- Odolczyk, N., Kiewcz, P.Z. (2014). Molecular modeling approaches for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator studies. *Int J Biochem & Cell Biol.*, 52, 39-46.
- Oliveira, A.S., Guaratini, M.I., Castro, C.E.S.(2005). Fundamentação Teórica para a Iontoforese. *Rev. bras. fisioter.*, 9(1), 1-7.
- Ooi, C., Dupuis, A., Gonska, T., Ellis, L., Ni, A., Jarvi, K., ... Durie, P. (2014). Does integration of various ion channel measurements improve diagnostic performance in cystic fibrosis? *Ann Am Thorac Soc.*, 11(4), 562–70.
- Parkins, R., Eidelman, S., Rubin, C., Dobbins, W. I., & Phelps, P. (1963). The diagnosis of cystic fibrosis by rectal suction biopsy. *Lancet*, 38, 851–6.
- Paulley, J. (1954). Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J.*, 2(4900), 1318–21.
- Pedemonte, N., Lukacs, G.L., Du, K., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Galletta, L.J.V., Verkman, A.S. (2005). Small-molecule correctors of defective deltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*, 115, 2564- 71.
- Procianoy, E.F.A. (2011). Diferença de potencial nasal: um novo teste para o diagnóstico de fibrose cística. *Rev HCPA*, 31(2), 125-130.
- Quinton, P. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, (301), 421–422.
- Quinton, P. (1999). Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev*, 79, S3–S22.
- Quinton, P. M., & Bijman, J. (1983). Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *N Eng J Med*, (19), 1185–1189.
- Quinton, P.M. (2007). Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology*, 22, 212–25.
- Quinton, P., Molyneux, L., Ip, W., Dupuis, A., Avolio, J., Tullis, E., ... Gonska, T. (2012). β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, 186(8), 732–9.

- Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., ... Elborn, J. S. (2011). A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *New England Journal of Medicine*, 365(18), 1663–1672.
- Raskin, S., Phillips III, J.A., Krishnamani, M.R.S. (1993). DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from guthrie cards. *Am J Med Genet*, 46, 665-9.
- Ribeiro, J.D, Ribeiro, M.A, Ribeiro, A.F. (2002). Controversies in cystic fibrosis: from pediatrician to specialist. *J Pediatr (Rio J)*, 78(2), 171-186.
- Riordan, J. R. (2008). CFTR function and prospects for therapy. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 701–26.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., ... Al., E. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922), 1066–1073.
- Rodrigues, R., Magalhaes, P., Fernandes, M., Gabetta, C., Ribeiro, A., Pedro, K., ... Maciel, L. (2009). Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study. *Braz J Med Biol Res.*, 42(10), 973–8.
- Rommens, J. M., Ianuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., ... Al., E. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245, 1059–1065.
- Rosenstein, B.J., Cutting, G.R. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.*, 132, 589-95.
- Rosell, J., Colominas, J., Riu, P., Pallas-Areny, R., & Webster, J. (1988). Skin impedance from 1 Hz to 1 MHz. *IEEE Trans Biomed Eng.*, 35(8), 649–51.
- Roth, E. K., Hirtz, S., Duerr, J., Wenning, D., Eichler, I., Seydewitz, H. H., ... Mall, M. A. (2011). The K Channel Opener 1-EBIO Potentiates Residual Function of Mutant CFTR in Rectal Biopsies from Cystic Fibrosis Patients. *PloS One*, 6(8), e24445.
- Rowntree, R.K., Harris, A. (2003). The phenotypic consequences of CFTR mutation. *Annals of Hum Genet*, 67, 471-85.
- Salvatore, F., Scudiero, O., Castaldo, G. (2002). Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J of Med Genet*, 111, 88-95.
- Sato, K., & Sato, F. (1984). Defective beta adrenergic response of cystic fibrosis sweat glands in vivo and in vitro. *J Clin Invest*, 73, 1763–1771.
- Schales, O. & Schales, S.S. (1941). Chloride in biological fluids for the determination of a simple and accurate method. *J. Biol. Chem.*, 140:879-884.
- Schmidt, R., Weidner, C., Schmelz, M. (2011). Time course of acetylcholine induced activation of sympathetic efferents matches axon reflex sweating in humans. *J Peripher Nerv Syst*, 16, 30–36.

- Schmunk, G., & Gargus, J. (2003). Unraveling Monogenic Channelopathies and Their Implications for Complex Polygenic Disease. *Am J Hum Genet*, 72(4), 785–803.
- Schüler, D., Sermet-Gaudelus, I., Wilschanski, M., Ballmann, M., Dechaux, M., Edelman, A., ... Knowles, M.R. (2004). Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros.*, 3 Suppl 2:151-5.
- Servidoni, M. F., Sousa, M., Vinagre, A. M., Cardoso, S. R., Ribeiro, M. A., Meirelles, L. R., ... Amaral, M. D. (2013). Rectal forceps biopsy procedure in cystic fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility. *BMC Gastroenterology*, 13(1), 91.
- Shah, U., & Moatter, T. (2006). Screening for cystic fibrosis: the importance of using the correct tools. *J.Ayub.Med.Coll.Abbottabad.*, 18(1), 7–10.
- Shwachman, H., Antonowicz, I., & Stern, M. (1961). The sweat test in cystic fibrosis. *Am J Dis Child*, 102, 769.
- Shwachman, H., Gahm, N. Studies in cystic fibrosis. (1956). Simple test for detection of excessive chloride on the skin. *N Eng J Med*, 255, 999-1001.
- Shwachman, H., Patterson, P.R., Laguna, J.(1949). Studies in pancreatic fibrosis: Simple gelatin film test for stool trypsin. *Pediatrics*, 4, 222-230.
- Sontag, M.K., Hammond, K.B., Zielenski, J., Wagener, J.S. & Accurso, F.J. (2005). Two-tiered immunoreactive trypsinogen-based newborn screening for cystic fibrosis in Colorado: screening efficacy and diagnostic outcomes. *J Pediatr.*, 147(3 Suppl):S83-8.
- Sontag, M.K., Corey, M., Hokanson, J.E., Marshall, J.A., Sommer, S.S., Zerbe, G.O., Accurso, F.J. (2006). Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *J Pediatr.*, 149(5):650-657.
- Sosnay, P., & Cutting, G. (2014). Interpretation of genetic variants. *Thorax*, 69(3), 295–7.
- Sousa, M., Servidoni, M., Vinagre, A., Ramalho, A., Bonadia, L., Felício, V., ... Amaral, M. (2012). Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies Constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis. *PloS One*, 7(10), e47708.
- Suarez-Kurtz G. (2005). Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci* ., 26(4), 196-201.
- Supryniewicz, F.A., Upadhyay, G., Krawczyk, E., Kramer, S.C., Hebert, J.D., Liu, X., ... Schlegel, R. (2012) Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(49):20035-40
- Taylor, C.J., Baxter, P.S., Hardcastle, J., Hardcastle, P.T. (1988). Failure to induce secretion in jejunal biopsies from children with cystic fibrosis. *Gut*, 29:957-962.

- Taylor, C. J., Hardcastle, J., & Southern, K. W. (2009). Physiological Measurements Confirming the Diagnosis of Cystic Fibrosis: the Sweat Test and Measurements of Transepithelial Potential Difference. *Paediatr Respir Rev*, 10, 220–226.
- Tsui, L., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., ... Doniskeller, H. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*, 230, 1054-1057.
- Veeze, H., Sinaasappel, M., Bijman, J., Bouquet, J., & De Jonge, H. (1991). Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology*, 101(2), 398–403.
- Wainwright, B., Scambler, P., Schmodtke, J., Watson, E., Law, H., Farrall, M., ... Williamson, R. (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*, 318, 384–385.
- Wallis, C. (1997). Diagnosing cystic fibrosis: blood, sweat, and tears. *Arch.Dis.Child.*, 76(2), 85–88.
- Webster, H.L. (1983). Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 18(4), 313-38
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., ... Sweeney, H.L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447(7140), 87-91.
- Welsh, M. J. & Smith, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.*, 73(7), 1251–1254.
- Wohl ME. (1994). Cystic fibrosis. *Pediatr Rev.*, 15(5), 192-200.
- Xiao, H., Li, D. & Liu, M. (2012). Knowledge translation: airway epithelial cell migration and respiratory diseases. *Cell Mol Life Sci.*, 69(24), 4149–62.
- Zielenski, J. & Tsui, L.C. (1995).Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.*, 29:777-807. Review.

7. APÊNDICES

Apêndice A: Table I-A - Overview of data for all CF patients in the reference group:

ID	Gender	Group Age (years)	CFTR Genotype		Age at Diagnosis (years)	Sweat Sodium Mean (mmol/L)	Sweat Chloride Mean (mmol/L)	Fecal Elastase (µg/g)	BMI	SK score	Last FEV1 (% predicted)	Last FVC (% predicted)
106/2010	F	0 - 9	F508del	G542X	2	101.6	116.1	10	22.62	80	88	86
84/2010	F	0 - 9	F508del	R1066C*	3	76	99.45	7.41	15.64	80	96	105
127/2007 ^a	Γ	0 - 9	F508del	F508del	8	108.8	116.5	2.17	15	65	84	93
126/2007 ^a	F	0 - 9	F508del	Z183AA>G*	3	111.7	119.5	8.57	14.59	70	68	75
54/2010	F	10 - 19	F508del	F508del	4	79	105.9	n.a.	16.06	55	38	52
107/2010	F	10 - 19	F508del [†]	S4X*	6	89	109.3	10	20.54	70	62	75
35/2010	M	20 - 29	F508del	F508del	21	89.75	119.56	2.44	21.58	55	58	89
19-101/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	0.5	117	140	6.81	14.65	60	101	78
73/2010	F	0 - 9	F508del	G542X	0.5	77.3	89	1	14.55	85	84	95
45/2010	F	0 - 9	F508del	F508del	0.4	110	130.03	7.83	15.59	70	n.a.	n.a.
109/2007	M	0 - 9	F508del	R1162X	2	109.5	120	1	12.81	40	31	27
25/2010	F	0 - 9	F508del	F508del	0.5	61.9	90.1	15.6	11.29	55	40	54
49/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	1	71.6	106.4	2.67	26.56	70	86	97
92/2010	Γ	0 - 9	F508del	F508del	0.5	-	108.5	16.97	20.57	95	n.a.	n.a.
88/2010	M	0 - 9	F508del	F508del	1	109	131.6	2.83	17.22	80	75	72
51/2010	M	0 - 9	F508del	F508del	0.2	96	103	3.85	16.9	60	92	99
103/2010	F	0 - 9	F508del	F508del	5	70.6	100.8	6.65	17.71	75	103	104
53/2010	F	0 - 9	F508del	F508del	1	76.82	121.6	5.38	14.61	85	n.a.	n.a.
46/2010	M	0 - 9	F508del	F508del	0.8	82	96.5	5.3	15.92	95	104	97
91/2010	M	0 - 9	F508del	1717-1G>A*	2	77.7	116	1.98	15.8	85	102	97
105/2010	F	0 - 9	F508del	1812-1G>A*	0.5	83.2	100.2	10	19.9	65	95	92
44/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	2	92.6	106.8	1	17.94	60	80	88
21/2010	Γ	20 - 29	F508del	R553X	1.5	74	135	6.71	21	60	45	61
30/2010	F	10 - 19	F508del	F508del	3	98.2	118.5	30.76	15.04	70	40	35
31/2010	Γ	10 - 19	F508del	G542X	3	81	121	16.56	20.21	85	54	59
06/2010	M	0 - 9	F508del	F508del	0.5	68.3	92.7	n.a.	13.59	45	64	92
48/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	7	99.5	106	12.19	21.16	65	77	74
139/2007	F	10 - 19	F508del	F508del	0.3	89.2	107.5	1	13.27	35	39	46
52/2010	M	0 - 9	F508del	F508del	5	82.5	93.2	7.19	27.32	65	82	92
78/2010	F	0 - 9	F508del	F508del	3	94.73	127.22	10	15.5	85	76	117
85/2010	F	10 - 19	F508del	G542X	8	118	140	n.a.	14.27	65	103	108
40/2010 ^b	M	0 - 9	F508del	F508del	0.3	89.07	108.4	10	13.44	60	44	48
41/2010 ^b	M	0 - 9	F508del	F508del	0.3	87.6	128.28	5.28	13.86	85	48	59
83/2010	F	10 - 19	F508del	F508del	0.3	92.8	125.6	10	14.31	65	94	116
108/2007	M	0 - 9	F508del	G542X	0.3	69.8	110.3	1	13.99	90	n.a.	n.a.
87/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	0.5	86.2	97.5	n.a.	16.64	90	86	83
65/2010	M	20 - 29	F508del	N1303K	0.3	136	147	5.17	23.98	55	41	48
37-81/2010	M	> 30	F508del	F508del	7	104.9	135.6	4.43	21.02	65	62	90
34/2010	Γ	10 - 19	F508del	F508del	0.4	84.6	106.7	7.19	13.29	80	55	65
71/2010	F	10 - 19	F508del	G542X	1	54.3	87.7	7.83	22.33	75	59	87
133/2007	M	10 - 19	F508del	F508del	0.5	114.3	154.4	6.87	15.91	90	89	97
82/2010	M	20 - 29	F508del	F508del	10	68.9	106.9	9.83	22.49	50	72	87
55/2010	F	10 - 19	F508del	F508del	3	92.2	100.4	10	22.99	60	74	77
110/2007	M	> 30	G542X	Z183AA>G*	2	91.7	101.86	n.a.	23.84	50	36	47
75/2010	Γ	10 - 19	F508del	1812-1G>A*	0.1	114.6	115.8	n.a.	18.77	80	81	89
50/2010	M	10 - 19	F508del	F508del	3	107.6	123.8	10	14.94	60	79	89
63/2010 ^c	F	> 30	F508del	R334W	38	94	145.4	229.16	25.44	80	65	79
64/2010 ^c	M	> 30	F508del	R334W	22	111.8	137.4	578.82	17.99	55	56	65
96/2010	F	10 - 19	F508del	G85E*	1	83.8	151	103.89	23.62	50	31	49
66/2010	F	> 30	F508del	3272-26A>G**	31	89.9	97	544.53	20.49	40	52	85
111/2007	Γ	20 - 29	G542X	I618T*	20	83.5	86.5	693.11	18	70	78	95

* - Data not known at the time of the study

§ - *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Sm*, *Stenotrophomonas maltophilia*; *Bc*, *Burkholderia cepacia*; *Ax*, *Achromobacter xylosoxidans*; *As*, *Aspergillus fumigatus*; *Mt*, *Mycobacterium tuberculosis*

- Maximum lumen-positive or lumen-negative peak (and lumen-negative plateau) CCH-induced I_{sc} in the presence of IBMX/Fsk are shown

§ - Percentage (%) of CFTR function was calculated for maximal CFTR activation ($AI_{sc, IBMX/Fsk} + AI_{sc, CCH(IBMX/Fsk)}$) and normalized to the correspondent mean value for the reference non-CF control group

a - First cousins

b - Monozygotic twins

c - Siblings

1 - TG1019/TG1117

**genotypes, clinical phenotypes and Ussing chamber measurements, leading to confirmation /
exclusion of a CF Diagnosis**

Pathogens detected (Lungs) [§]	Nasal Polyposis	Meconium Ileus	Glucose Intolerance (GI) / Diabetes	Osteopenia / Osteoporosis	Other Clinical Features	basal Isc-CCH ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Isc-IBMX/Fsk ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	Isc-CCH (IBMX/Fsk) ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) [§]	% CFTR Function [§]	Clinical Diagnosis
Sa, Pa, Af	Negative	Negative	Diabetes	Negative	Hepatic Steatosis; Verminosis	29.42	20.37	22.77 (-5.29)	2	Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	Hepatic Steatosis	12.65	3.59	10.73 (-2.48)	1	Classic CF
Sa	Negative	Negative	Diabetes / GI	Negative	-	18.93	4.55	13.61 (0)	0	Classic CF
Sa	Negative	Negative	Diabetes / GI	Negative	Hepatic Steatosis	25.4	7.95	35.42 (0)	0	Classic CF
Sa	Positive	Negative	GI	Osteoporosis	-	17.39	6.02	15.1 (0)	0	Classic CF
Pa, Sa	Positive	Negative	GI	Osteoporosis	-	45.43	12.91	21.42 (-5.25)	2	Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	GI	Osteopenia	-	15.96	12.82	18.56 (-3.94)	2	Classic CF
Pa, Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	Chronic liver disease	43.69	9.61	29.22 (-9.19)	4	Classic CF
Sa	Positive	Positive	Negative	Negative	-	20.62	5.03	20.3 (-3.55)	2	Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	43.41	6.75	35.59 (0)	0	Classic CF
n.a.	Negative	Positive	Negative	Negative	Chronic liver disease	35.1	14.57	84.89 (0)	0	Classic CF
Sa, Bc, Pa	Negative	Positive	Negative	Negative	Digital clubbing; lung hyperinflation;	34.77	10.35	27.37 (-2.54)	1	Classic CF
Pa	Negative	Negative	Negative	Osteoporosis	Chronic liver disease	20	10.21	14.84 (-1.12)	1	Classic CF
Normal Flora	Negative	Negative	Negative	Negative	-	19.15	7.2	18.66 (-9.32)	4	Classic CF
Normal Flora	Negative	Negative	Negative	n.a.	-	55.52	28.22	34.79 (-4.83)	2	Classic CF
Sa	Negative	Positive	Negative	Negative	-	15.32	5.94	17.74 (0)	0	Classic CF
Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	Digital clubbing; steatorrhea	45.07	17.43	50.2 (0)	0	Classic CF
Pa	Negative	Positive	Negative	Negative	Biliary thiasis	25.18	5.7	29.76 (0)	0	Classic CF
Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	Failure to thrive; malabsorption	19	16.15	7.07 (-2.39)	1	Classic CF
Pa, Sa	Negative	Positive	Negative	Negative	-	97.63	18.41	58.68 (-2.66)	1	Classic CF
Sa	Negative	Negative	Diabetes	Negative	-	32.12	21.16	53.9 (-4.96)	2	Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	21.36	12.5	15.39 (-1.5)	1	Classic CF
Pa	Positive	Negative	Diabetes / GI	Osteoporosis	Digital clubbing; colic thiasis	9.4	10.55	19.91 (0)	0	Classic CF
Sa, Bc	Negative	Negative	Negative	Negative	Renal thiasis; liver disease	24.88	18.58	22.78 (0)	0	Classic CF
Sa, Ax, Af	Negative	Negative	Negative	Negative	Esophagitis	10.72	12.26	18.78 (-0.31)	0	Classic CF
Pa	Negative	Positive	Negative	Negative	Digital clubbing; gastrectomy	81.67	6.66	35.47 (-2.34)	0	Classic CF
Sa	Positive	Negative	Negative	Negative	Failure to thrive; hepatic steatosis	41.34	8.27	40.1 (-1.34)	1	Classic CF
n.a.	Negative	Negative	Negative	Osteoporosis	Oxygen dependent; lobectomy; liver	21.54	10.33	21.84 (0)	0	Classic CF
Sa	Positive	Positive	n.a.	Negative	Bilateral nasal polypectomy	18.69	10.52	20.43 (0)	0	Classic CF
Pa, Sa, Sm	Negative	Positive	Diabetes	Negative	Hepatic steatosis	28.27	18.48	28.52 (0)	0	Classic CF
Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	34.09	12.55	24.63 (0)	0	Classic CF
Sa	Negative	Positive	Negative	Negative	-	24.01	12.34	20.88 (0)	0	Classic CF
Sa	Negative	Positive	Negative	Negative	Hepatic steatosis	25.85	13	16.52 (0)	0	Classic CF
Sa, Pa	Positive	Negative	Negative	Negative	Hepatic steatosis; IgA deficiency	31.7	4.72	17.36 (0)	0	Classic CF
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative	Failure to thrive; metabolic alkalosis	50	12.2	56.87 (0)	0	Classic CF
Pa	Positive	Negative	Diabetes	Negative	Failure to thrive	50.55	15.6	33.91 (-4.42)	2	Classic CF
Pa, Sa, Bc	Negative	Negative	Diabetes	Osteopenia	Two sisters with CF	31.83	5.8	30.37 (0)	0	Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	Diabetes / GI	Negative	Hepatic steatosis; Barrett's esophagus	49.22	9.02	14.22 (0)	0	Classic CF
Pa, Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	57.6	9.74	31.18 (-5.34)	2	Classic CF
Pa	Positive	Negative	GI	Negative	-	10.43	7.35	14.84 (-2.80)	1	Classic CF
Pa, Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	14.46	10.32	25.36 (0)	0	Classic CF
Bc, Sa, Af	Negative	Negative	GI	Osteoporosis	Digital clubbing; azoospermia	18.12	6.74	12.27 (0)	0	Classic CF
Sa, Pa, Af	Negative	Positive	Negative	Negative	-	24.17	16.08	39.93 (0)	0	Classic CF
Sm, Af	Negative	Negative	Negative	Negative	-	21.65	15.17	23.47 (0)	0	Classic CF
Sa, Pa	Positive	Negative	Negative	Negative	-	30	12.95	34.87 (0)	0	Classic CF
Sa, Pa, Af	Negative	Negative	Negative	Negative	-	25.85	3.32	9.4 (-3.39)	2	Classic CF
Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	7.49	-12.94	5.31 (-9.59)	10	Non-Classic CF
Sa, Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	17.33	-15.54	8.7 (-14.24)	14	Non-Classic CF
Pa, Bc	Positive	Negative	Diabetes	Negative	-	96.36	-13.8	67.47 (-12.14)	12	Non-Classic CF
Pa, Sa	Negative	Negative	Negative	Negative	-	23.87	-11.74	23.12 (-19.13)	14	Non-Classic CF
Sa, Af	Negative	Negative	Negative	Negative	Allergic Bronchopulmonary	46.89	-27.31	36.17 (-53.07)	37	Non-Classic CF

Apêndice A: Table I-B - Overview of data for all individuals in the CF-suspicious group:

ID	Gender	Group Age (years)	CFTR Genotype		Age at Diagnosis (years)	Sweat Sodium Mean (mmol/L)	Sweat Chloride Mean (mmol/L)	Fecal Elastase E1 (µg/g)	BMI	SK score	Last FEV1 (% predicted)	Last FVC (% predicted)
95/2010	F	0 - 9	F508del*	F508del*	0.5	-	126*	1	13	35*	45	61
38/2010	F	20 - 29	A561E*	A561E*	20	54.4*	58.3*	11.02	17.83	60	57	70
119/2007	F	0 - 9	R1162X*	R1162X*	1	70.34 ^d	115 ^b	1	13.61	55	n.a.	n.a.
09/2010	M	0 - 9	F508del*	F508del*	0.2	-	120*	1.37*	22.93	75*	n.a.	n.a.
43/2010 ^a	M	0 - 9	F508del*	F508del*	1	104 ^d	147 ^b	8.1	15.77	70	n.a.	n.a.
118/2007	F	0 - 9	F508del	1717-1G>A*	0.2	90 ^d	110 ^b	n.a.	16.26	90	131	142
33/2010 ^b	M	0 - 9	3120+1G>A*	R1066C* ¹	2	95.9 ^d	129 ^b	10	13.99	55	73	75
32/2010 ^b	M	0 - 9	3120+1G>A*	R1066C* ¹	0.5	115.6 ^d	129.2 ^b	4.18	14.34	40	n.a.	n.a.
86/2010	F	0 - 9	F508del	S549R(T>G)* ⁷	0.5	71.76 ^d	109.8 ^b	97.51	16.19	80	n.a.	n.a.
27/2010 ^c	F	0 - 9	W1282X ²	-	1	-	49.7*	37.74	16.5	90*	n.a.	n.a.
60-98/2010	F	> 30	3120+1G>A*	L205W* ^d	30	86.3 ^d	122.8 ^b	606.13*	24.77	55	70	76
136/2007 ^d	M	10 - 19	F508del	1716+18672 A>G*	12	65.9 ^d	95 ^b	68.89*	21.72	95	111	102
135/2007 ^d	F	10 - 19	F508del	1716+18672 A>G*	10	83.6*	87*	608.36*	21.12	85	104	99
123/2007	F	> 30	F508del	P205S*	30	78 ^d	107.6 ^b	668.19*	19.61	45*	58	67
137/2007	M	20 - 29	G542X	P205S*	21	97.6	124.3	816.07*	18.69	40*	60	43
124/2007	F	20 - 29	G542X*	R334W*	20	99.8	113.9	379.96*	25.89	80	46	69
15/2010	F	0 - 9	Negative for: F508del and R1162X		-	64.75	66.39	747.57*	15.1	90	106*	128*
131/2007	F	> 30	n.i.* ²		-	54.2	58.65	875.4*	14.87	55	n.a.	n.a.
90/2010	F	0 - 9	Negative for: F508del ^c		-	-	45*	n.a.	14.48	n.a.	n.a.	n.a.
72/2010	F	10 - 19	Negative for: F508del, G551D, G542X,		-	55.3	54.5	635.8*	17.62	90*	73	92
128/2007	F	10 - 19	Negative for: F508del and N1303K		-	18.8	26.9	n.a.	16.01	95*	54	72
121/2007	M	> 30	n.i.* ²		-	26.3*	22.6*	6.66	20.11	95	93	94
13/2010	M	10 - 19	Negative for: F508del*		-	65.3 ^d	62.8 ^b	629.43*	28.34	95*	84	90
89/2010	M	0 - 9	Negative for: F508del* ^e		-	51	40	n.a.	14.44	70*	76*	104*
102/2010	M	> 30	Negative for: F508del* ¹		-	-	23	n.a.	24.91	n.a.	n.a.	n.a.
68/2010	M	20 - 29	n.i.* ¹		-	45.3*	47.3*	524.25	28.15	95*	82	92
130/2007	M	20 - 29	n.i.* ²		-	53.5	63.9	524.25	17.92	75	84	70
132/2007	F	10 - 19	n.i.* ²		-	77.4	82.2	774.4*	15.82	55	74	71
114/2007	F	20 - 29	Negative for: F508del*		-	-	25.3	n.a.	17.99	n.a.	n.a.	n.a.
122/2007	M	20 - 29	n.i.* ²		-	71.7	76.3	683.15*	24.22	100*	72	88
140/2007	M	10 - 19	n.i.* ¹		-	66.6	80.4	524.25	24.42	80*	83*	101*
18/2010	F	10 - 19	Negative for: F508del*		-	75.1	77.2	407.4*	19.81	100*	82*	78*
08/2010	M	10 - 19	Negative for: F508del		-	73.3	69.2	n.a.	28.26	95*	94	96
117/2007	M	10 - 19	Negative for: F508del, G542X, R1162X and		-	18.7 ^d	14 ^b	855.07*	21	95*	106*	94*
115/2007	M	0 - 9	Negative for: F508del*		-	-	38	n.a.	15.03	n.a.	n.a.	n.a.
116/2007	M	> 30	n.i.* ¹		-	-	19.7	524.25	15.85	80	n.a.	n.a.
42/2010 ^a	M	0 - 9	F508del*	-	-	93 ^d	108 ^b	n.a.	16.06	95	96	91
74/2010	M	10 - 19	Negative for: F508del, R1162X and N1303K		-	84	85	340*	18.72	85	90	94
61/2010	M	> 30	n.i.* ¹		-	84 ^d	88.7 ^b	524.25	24.86	95	82	92
70/2010 ^a	F	10 - 19	Negative for: F508del and R1162X		-	65.8	70.5	612.3*	12.43	100*	68	74
100/2010	F	10 - 19	Negative for: F508del* ⁷		-	-	42	682.83*	15.67	80	85	106
138/2007	M	10 - 19	Negative for: F508del*		-	41	51.5	n.a.	25	n.a.	n.a.	n.a.
99/2010	F	> 30	F508del	D1152H*	35	71.1*	72.25*	611.55*	19.96	60*	63	60
76/2010 ^c	M	> 30	W1282X	4428InsGA*	49	105.5*	136.2*	640.57*	26.22	95*	82*	91*
134/2007	F	0 - 9	G576A*	-		31.1	31.8	773.57*	15.41	95*		
07/2010	M	20 - 29	V562I*	n.i.* ⁸		53.3	52.6	592.72*	21.91	75	40	21
125/2007	M	0 - 9	G542X	Negative for: F508del, G551D, G542X, R1162X and	-	14.6	20	n.a.	16.84	n.a.	n.a.	n.a.
26/2010	M	0 - 9	Negative for: F508del and R1162X		-	49.6	50.5	n.a.	14.87	90*	n.a.	n.a.
69/2010 ^c	M	10 - 19	Negative for: F508del		-	84	85	n.a.	16.55	100*	97*	98*

a - Siblings

b - Siblings

c - Patient 76/2010 is father (by in vitro fertilization) of patient 27/2010

d - Siblings

e - Siblings

1 - TG1117/TG1117

2 - TG1019/TG1117

3 - TG1017/TG1215

4 - TG919/TG1017

5 - TG1217/TG1217

6 - TG1017/TG1217

7 - TG1017/TG1017

8 - TG1017/TG1115

9 - TG1115/TG1117

genotypes, clinical phenotypes and Ussing chamber measurements, leading to confirmation / exclusion of a CF

Diagnosis

Pathogens detected (Lungs)§	Nasal Polyposis	Meconium Ileus	Glucose Intolerance (GI) / Diabetes	Osteopenia / Osteoporosis	Other Clinical Features	basal Isc-CCH (μA/cm ²)	Isc-IBMX/Fsk (μA/cm ²)	Isc-CCH (IBMX/Fsk) (μA/cm ²) ^g	% CFTR Function ^h	Clinical Diagnosis
n.a.	n.a.	Positive*	Negative*	Negative*		47.3	20.4	90.19 (0)	0	Classic CF*
Sa, Pa, Sm	Negative*	Negative*	Diabetes / GI	Negative	Digit clubbing	23.1	12.23	28.31 (0)	0	Classic CF*
Sa	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*	Failure to thrive	22.42	34.22	28.66 (0)	0	Classic CF*
n.a.	Negative*	Positive*	Negative*	Negative*		92.5	3.95	17.08 (-8.51)	4	Classic CF*
Sa, Pa, Bc	Negative*	Negative	Negative	Negative		15.9	5.04	38.99 (0)	0	Classic CF*
Sa	Negative*	Positive	Negative	Negative	Chronic liver disease; steatorrhea;	11.46	28.26	33.89 (0)	0	Classic CF*
Sa, Pa	Negative*	Negative*	Negative	Negative*		46.2	10.08	28.85 (0)	0	Classic CF*
Candida	Negative*	Positive	Negative	Negative*		55.09	11.74	66.05 (0)	0	Classic CF*
Sa	Negative*	Negative	Negative	Negative*	Metabolic alkalosis	13.17	-7.08	14.72 (-4.51)	5	Classic CF*
n.a.	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*	Congenital cardiopathy	55.5	-42.1	6.73 (-36.36)	36	Non-Classic CF*
Pa, Sa, Af	Negative*	Negative*	Negative*	Osteoporosis	Bronchiectasis; lung exacerbations	30.84	-47.31	5.47 (-76.34)	57	Non-Classic CF*
Sa	Positive	Negative	Negative	Osteoporosis		22.57	-21.12	8.47 (-40.7)	28	Non-Classic CF*
Sa	Positive	Negative	GI	Negative		34.16	-22.36	27.81 (-50.71)	34	Non-Classic CF*
Pa	Negative*	Negative*	Negative*	Negative	Hypothyroidism	28.13	-12.03	7.68 (-10.37)	10	Non-Classic CF*
Pa	Negative	Negative	Diabetes	Osteoporosis	Azoospermia; hepatic steatosis;	25.67	-7.42	14.72 (-19.91)	13	Non-Classic CF*
Sa, Pa	Positive	Negative	Negative	Negative		26.3	-17.5	14.52 (-18.1)	16	Non-Classic CF*
Sa, Mt*	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*		-149.68	-178.11	-254.89	199	Non-CF*
n.a.	Positive	Negative*	Negative*	Osteoporosis		-86.6	-30.58	-138.61	78	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative*	Negative	Negative*	Pneumonia; diarrhea	-211.11	-53.66	-249.34	139	Non-CF*
n.a.	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*		-124.27	-20.29	-117.3	63	Non-CF*
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Negative		-96.25	-12.22	-53.59	30	Non-CF*
Normal Flora	Negative	Negative	Diabetes	Negative	Severe steatorrhea	-83.01	-24.14	-155.09	82	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative	n.a.	Negative	Obesity; dyspnea; thalassemia trait	-176.86	-45.9	-104.02	69	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative		-100.02	-193.88	-379.46	263	Non-CF*
Normal Flora	Positive	Negative	Negative	n.a.	Normal spermogram; reproductive	-232.43	-13.68	-213.78	104	Non-CF*
n.a.	Negative*	Negative	Negative*	Negative		-66.11	-14.33	-145.89	73	Non-CF*
Normal Flora	Negative*	Negative	Negative*	Negative	Oligozoospermia	-39.67	-46.56	-102.25	68	Non-CF*
Normal Flora	Negative*	Negative*	Negative*	Osteopenia	Digit clubbing; liver disease;	-30.34	-33.71	-190.95	103	Non-CF*
n.a.	Positive	Negative	Negative	Negative	Bronchiectasis; pansinusopathy;	-61.24	-37.2	-101.98	64	Non-CF*
n.a.	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*	Good ponderal status	-80.79	-29.24	-149.01	82	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative*	Negative*	Osteopenia	Chronic diarrhea; dermatomyositis;	-44.96	-110.05	-347.21	210	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative*	Negative*	Negative*	Repeated pancreatitis	-136.1	-42.95	-129.51	79	Non-CF*
n.a.	Positive	Negative*	Negative*	Negative*	Normal spermogram; nasal	-45.67	-73.39	-176.82	115	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative	Failure to thrive; steatorrhea; asthma;	-65.35	-57.23	-137.09	89	Non-CF*
Normal Flora	Negative	Negative	Negative	Negative	Duodenal ulcer; pancreatic calculus;	-91.11	-17.49	-57.36	34	Non-CF*
Pa	Negative	Negative	Negative	Negative	Normal spermogram; Bronchiectasis	-61.72	-22.04	-93.59	53	Non-CF*
Normal Flora	Negative*	Negative	Negative	Negative		-24.07	-15.78	-50.16	30	Non-CF*
Sa	Negative	Negative	Diabetes	Negative	IgA deficiency	-70	-34.72	-89	57	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative	Repetitive pneumonias; obesity	-67.09	-24.91	-117.72	65	Non-CF*
n.a.	Positive	Negative	Negative	Negative		-128.84	-27.83	-141.64	78	Non-CF*
Normal Flora	Negative	Negative	Negative	Negative	Pansinusopathy	-406.51	-46.11	-247.23	135	Non-CF*
n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	CT scan: bronchial wall thickening	-93.91	-28.87	-154.23	84	Non-CF*
n.a.	Negative	Negative	Negative	Osteoporosis		51.47	-42.69	-97.69	64	CFTR-RD*
n.a.	Positive	Negative	Negative	Negative*	Constructive Azoospermia (CBAVD)	54.77	-83.85	-99.19	84	CFTR-RD*
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative	Neuroblastoma*	-	-	-	-	Inconclusive
Sa, Pa	Positive	Negative	Negative	Osteoporosis	Bronchiectasis and obstructing	-	-	-	-	Inconclusive
n.a.	Negative	Negative	Negative	Negative		-	-	-	-	Inconclusive
n.a.	Negative*	Negative*	Negative*	Negative*		-	-	-	-	Inconclusive
n.a.	Positive	Negative	Negative	Negative	Repetitive pneumonias	-	-	-	-	Inconclusive

Apêndice B

Table II – CF patients and CFTR genotypes (n=67).

CF Patients (n)	CFTR genotype
33	F508del/F508del
6	F508del/G542X
2	F508del/1716+18672 A>G
2	F508del/1717-1G>A
2	F508del/1812-1G>A
2	F508del/R334W
2	3120+1G>A/R1066C
1	F508del/2183AA>G
1	G542X/2183AA>G
1	F508del/3272-26A>G
1	A561E/A561E
1	F508del/G85E
1	G542X/I618T
1	W1282X/L206W
1	3120+1G>A/L206W
1	F508del/N1303K
1	F508del/P205S
1	G542X/P205S
1	F508del/R1066C
1	F508del/-
1	F508del/R1162X
1	R1162X/R1162X
1	G542X/R334W
1	F508del/R553X
1	F508del/S549R(T>G)

Apêndice C – Suplemento 1

Histórico da TNN no Brasil

A TNN no Brasil foi implantada por fases, tendo iniciado em São Paulo em 1974, pelo Professor Benjamin Schmidt, da Universidade Federal de São Paulo na APAE (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais)/SP, tendo início com a triagem de fenilcetonúria. Em 1978 houve a implantação da triagem do hipotireoidismo congênito, que foi obrigatória no estado de SP por lei estadual a partir de 1983 (Medeiros Neto G, 2004). Em 1992, na Unicamp se iniciou a triagem das hemoglobinopatias no CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância), em 1997, por lei municipal, na cidade de Campinas/SP, a triagem passou a ser obrigatória para as hemoglobinopatias. Em 2001 (portaria GM/MS nº 822-06/06/2001), foram criados os Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes triados no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), nesse momento instituído de forma oficial, que desenvolveu protocolos clínicos e diretrizes, promoveu capacitação profissional e a busca ativa dos pacientes triados.

O programa de TNN no Brasil foi dividido em fases de implantação devido a diversidade de recursos dos diferentes estados do país. A fase I inclui a triagem da fenilcetonúria e hipotireoismo congênito, a fase II inclui as hemoglobinopatias, a III a FC e a IV a deficiência de biotinidase e hiperplasia de adrenal congênita.

A TNN da FC prevista desde 2001 (GM/MS nº 822), foi instituída em SP inicialmente por mandato judicial e oficializada em 2010 (Resolução SS23 e Portaria 224). Em 21 de março de 2013, a portaria 288 do Diário Oficial da União oficializa a investigação da FC em todo o Brasil, com intenção de implantação de todas as fases da TNN em todo o país até o final de 2014 por lei federal.

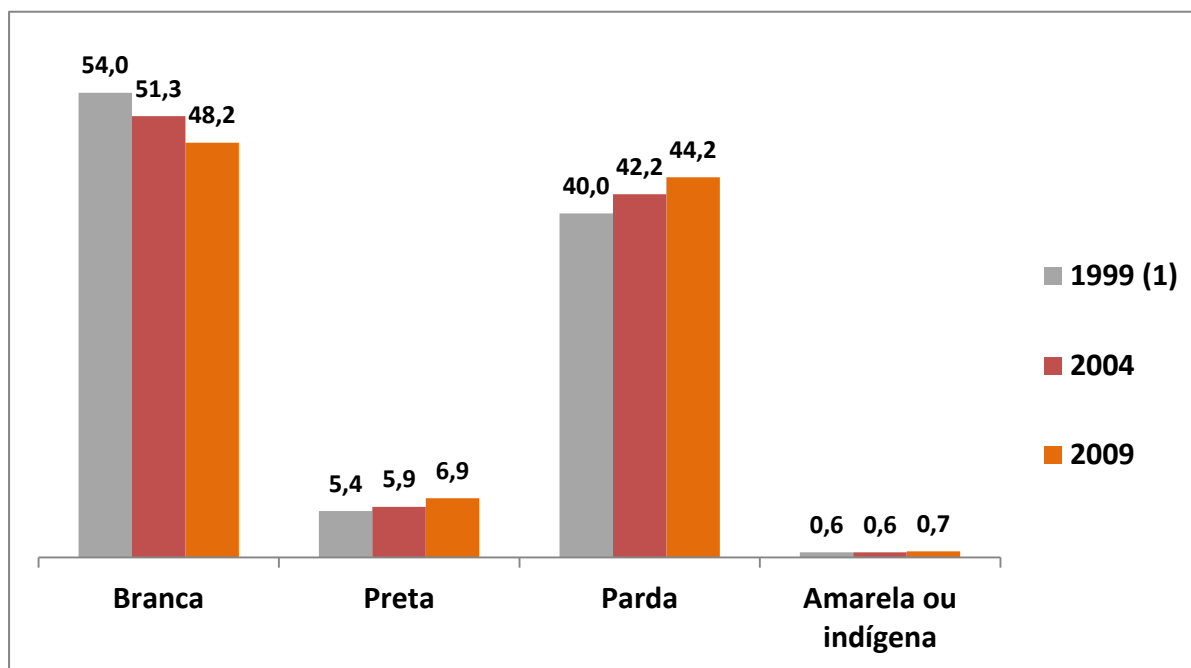
Após a confirmação de FC no Brasil, o acompanhamento do pacientes é realizada em centros de referencia conforme a tabela a seguir. Sendo a sua grange maioria ligada ao SUS (Sistema Único de Saúde).

Tabela III: Distribuição dos centros de referência considerando os estados do Brasil, cidade de localização e o nome do centro de referência.

Estado	Cidade	Centro
AL	Maceió	Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes – UFAL
BA	Salvador	Hospital Especializado Otávio Mangabeira
		Hospital Universitário Prof. Edgar Santos
CE	Fortaleza	Hospital Infantil Albert Sabin
DF	Brasília	Hospital da Criança de Brasília– Hospital de Base Brasília
ES	Vitória	Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória
		Hospital Dr. Dório Silva (adultos)
GO	Goiânia	Hospital das Clínicas da UFGO – (adultos)
		Hospital das Clínicas da UFGO
MG	Belo Horizonte	Centro Médico Pediátrico
		Hospital Infantil João Paulo II
		Hospital Universitário da UFJF
	Uberlândia	Hospital das Clínicas da UFU
MS	Campo Grande	Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
MT	Cuiabá	Hospital Universitário Júlio Muller
PA	Belém	Hospital Universitário João de Barros Barre
PB	João Pessoa	Hospital da Universidade Federal da Paraíba
	Campina Grande	Universidade Federal de Campina Grande
PE	Recife	Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira
PI	Teresina	Hospital Infantil Lucídio Portela
PR	Curitiba	Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes – UFAL
		Hospital das Clínicas da UFPR (pediatria)
		Hospital das Clínicas da UFPR (adultos)
	Cascavel	Hospital Universitário do Oeste do Paraná
RJ	Rio de Janeiro	Instituto Fernandes Figueira
		Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ
		Hospital dos Servidores Públicos do Estado do Rio de Janeiro
RN	Natal	Hospital de Pediatria da Universidade do Rio Grande do Norte
RS	Porto Alegre	Hospital da Criança Santo Antônio
		Hospital de Clínicas da UFRGS (pediatria)
		Hospital de Clínicas da UFRGS (adultos)
		Hospital São Lucas da PUC
SC	Florianópolis	Hospital Infantil Joana de Gusmão
		Hospital Nereu Ramos (adultos)
	Blumenau	Hospital Santa Isabel
	Joinville	Hospital Infantil Jeser Amarante Faria
SP	São Paulo	Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo São
		Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da USP
		Hospital das Clínicas da USP (adultos)
		Centro de Puericultura –CPAP
		Hospital da UNIFESP

	Consultório Fabíola Adde
Ribeirão Preto	Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto
Campinas	Hospital das Clínicas da UNICAMP (pediatria)
	Hospital das Clínicas da UNICAMP (adultos)
Botucatu	Hospital das Clínicas da UNESP
São José do Rio Preto	Hospital de Base da Fac. de Medicina de São José do Rio Preto

Apêndice D – Suplemento 2



Distribuição percentual da população, por cor ou raça, Brasil 1999 a 2009. Fonte IBGE- Pesquisa Nacional por amostras de domicílio 1999/2009.

(1) Exclusive a população rural de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará e Amapá.

Apêndice E – Suplemento 3

Teste do Suor Questionário

Nome do local avaliado: _____

DATA: _____ Cidade: _____

1.0-Pré- estimulação

1.01- Você fornece qualquer informação para os pais dos pacientes relacionado ao teste do suor?

a) Não

b) Sim

Se sim, de que forma?

C1) verbal

C2)escrito e verbal

C3)escrito

1.02- Você faz alguma orientação para o paciente antes de realizar o teste?

a) Não

b) Sim

Se **sim** indique a sua orientação

C1) Tomar água

C2) Fazer jejum

C3) Outros, especifique: _____

1.03- Você tem critério que exclui um paciente de submeter a um teste do suor? (selecione todos que se aplicam)

a) Menos do que 1 ano de idade

b) Menos de que 2 anos de idade

c) Menos do que 4 anos de idade

d) Menos do que 3,5kg de peso

e) Desidratação

f) Desnutrição

g) Doença aguda

h) Utilização contínua de corticóides

i) Eczema no local da estimulação

j) Sobre oxigênio por um sistema de entrega aberto

k) Outros (especifique): _____

1.04- Você tem um termo de consentimento livre e esclarecido?

a)sim

b) não

Obs: Se sim anexar o termo de consentimento

1.05- Onde é realizado o teste de suor (coleta e dosagem)?

a) Ambos no laboratório

- b) Ambos na clínica
- c) Coleta na clínica e a amostra de suor analisada no laboratório
- d) Outros (especifique): _____

1.06- Em seu serviço quantos pacientes são anualmente testados o suor?

- a) 25-49
- b) 50-99
- c) 100-300
- d) 300-500
- e) >500

1.07- Quantos testes do suor são realizados por você durante um ano?

- a) <10%
- b) $\geq 30\%$
- c) $\geq 50\%$
- d) 100%

a) 1.08- Onde e com quem você fez o treinamento para realizar o teste de suor?

- a) Curso (especifique qual): _____
- b) No próprio local de trabalho e com um colega que também realiza o teste
- c) Outros (especifique): _____

1.11- Conhece ou segue algum consenso internacional?

- a) Sim
- b) Não
- c) Se sim especifique qual _____

2.0- Estimulação

2.01-Técnica:

- a) pilocarpina
- b) sem técnica _____
- c) outra técnica _____

2.02- Qual equipamento que você utiliza para a estimulação?

- a) caseiro: especifique _____
- b) sem aparelho _____
- b) Iontoquite (BH) _____
- c) Macroduct Wescor Sweat Check _____
- d) Wescor Nanoduct _____
- e) Outros: _____

2.03- Antes de começar a estimulação você realiza a limpeza da pele?

- a) Sim
- b) Não

Se **sim** identifique qual a solução utilizada para a limpeza da pele:

- C1) água da torneira
- C2) água destilada
- C3) água bidestilada
- C4) álcool
- C5) outros (especifique):_____

2.04- Antes de começar a estimulação você também seca a pele do paciente?

- a) Sim
- b) Não

Se sim, especifique como você realiza a secagem da pele

- C1) Algodão
- C2) Gaze compressa
- C3) Gaze tipo queijo
- C4) Toalha
- C5) Outros:_____

2.05- O ambiente do local onde é realizado o teste de suor é climatizado?

- a) Não
- b) Sim, temperatura de:_____

2.06- Os testes do suor, coletados e analisados, são rotineiramente realizados em 2 lugares do corpo (por ex. teste bilateral)

- a) Nunca
- b) Sempre faço a estimulação bilateral para comparar os diagnósticos
- c) Às vezes quando a primeira amostra não atinge a quantidade de suor suficiente eu utilizo o teste bilateral, mas nunca faço a união das amostras para realizar a análise laboratorial
- d) Quando não consigo uma amostra suficiente para fazer a análise do suor eu utilizo o teste bilateral para unir as duas amostras e realizar a análise laboratorial

2.07- Qual é a quantidade, marca e como é preparada a pilocarpina utilizada?

- Concentração:_____ (ml)
- Marca:_____
- Como é preparada:_____
- Não sei

2.08- Qual é a quantidade, marca e como é preparado o ácido sulfúrico utilizado?

- Concentração:_____ (ml)
- Marca:_____
- Como é preparado:_____
- Não sei

2.09- Qual é o tamanho e o material do eletrodo utilizado para a estimulação?

- Tamanho: _____
- Material: _____
- Não sei

2.10- Você tem uma distancia padrão entre os eletrodos?

- a) Não
- b) Sim

Se **sim** especifique de acordo com a faixa etária

C1) recém nascidos e lactentes: _____ centímetros

C2) crianças: _____ centímetros

C3) adolescentes e adultos: _____ centímetros

2.11- Qual é o tipo de corrente utilizada para a estimulação?

- a) Corrente contínua constante
- b) Corrente contínua pulsada
- c) Não sei
- d) Outras (especifique): _____

2.12- A corrente utilizada para estimulação do suor varia de acordo com a idade?

- a) Não
- b) Sim

Se sim, descreva a variação por idade

a) 0 a 1 ano: _____

b) 2 a 3: _____

c) 4 a 7: _____

d) 8 a 12: _____

e) 12 a 18: _____

f) > 18: _____

2.13- A estimulação elétrica com os eletrodos é realizada durante quanto tempo?

- a) < 5 minutos
- b) 5 minutos
- c) 10 minutos
- d) > 10 minutos (especifique): _____

2.14- É realizada a manutenção do aparelho utilizado para estimular o suor utilizado no seu serviço?

- a) Não
- b) Não sei
- c) Sim

Se **sim**, assinale a alternativa com o tempo que você realiza a manutenção

C1) a cada 6 meses

C2) 1 vez por ano

C3) a cada 2 anos

C4) mais de 2 anos

2.15. Quem realiza a manutenção do seu aparelho de estimular o suor? E onde é realizada essa manutenção?

- a) Engenheiro, local: _____
- b) Técnico, local: _____
- c) Não sei

2.16- Ao término da estimulação, antes de iniciar a coleta do suor você realiza a limpeza da pele?

- a) Sim
- b) Não

Se **sim** identifique qual a solução utilizada para a limpeza da pele:

- C1) água da torneira
- C2) água destilada
- C3) água bidestilada (deionizada)
- C4) álcool
- C5) outros (especifique): _____

2.17- Ao término da estimulação você também seca a pele do paciente?

- d) Sim
- e) Não

Se sim, especifique como você realiza a secagem da pele

- C1) Algodão
- C2) Gaze compressa
- C3) Gaze tipo queijo
- C4) Toalha
- C5) Outros: _____

3.0- COLETA

3.01- Quando você coleta o suor, no momento da retirada da amostra do suor até o momento de levá-lo para pesar, você faz esse procedimento com algum auxílio?

- a) Sim
 - b) Não
- Se **sim**, indique qual auxílio você utiliza:
- C1) Luvas de procedimento com talco
 - C2) Luvas de procedimento sem talco
 - C3) Pinças

3.02- O que você utiliza para realizar a coleta do suor?

- a) espiral de Macroduct
- b) gaze pré pesada (quantas gazes, gaze em compressa ou tipo queijo e qual a marca) _____
- c) papel filtro pré pesado (quantos, tamanho, numero do papel e a marca) _____
- d) tubo coletor
- e) eletrodo orion de mensuração de cloro
- f) fita indicadora de fibrose cística
- g) nanoduct

h) Não sei

3.03- De acordo com o procedimento utilizado para coletar o suor, marque um X no tempo necessário que você considera o ideal para realizar a coleta o suor?

- a) Espiral de Macroduct: () < 20min, () 20- 30 min, () 30 min, () 40-50 min () 60 min ou +
- b) Gase pré-pesada: () < 20min, () 20- 30 min, () 30 min, () 40-50 min, () 60 min ou +
- c) Papel filtro pré pesado: () < 20min, () 20- 30 min, () 30 min, () 40-50 min, () 60 min ou +
- d) Tubo coletor: () < 20min, () 20- 30 min, () 30 min, () 40-50 min, () 60 min ou +
- e) eletrodo orion de mensuração de cloro: () < 20min, () 20-30 min, () 30 min, () 40-50 min () 60 min ou +
- f) fita indicadora de fibrose cística: () < 20min, () 20-30 min, () 30 min, () 40-50 min, () 60 min ou +
- g) nanoduct: () < 20min, () 20- 30 min, () 30 min, () 40-50 min, () 60 min ou +

3.04- De acordo com o procedimento utilizado para coletar o suor, especifique o mínimo de suor aceito (peso)?

- a) Espiral de Macroduct: _____
- b) Gase: _____
- c) Papel filtro: _____
- d) tubo coletor: _____
- e) eletrodo orion de mensuração de cloro: _____
- f) fita indicadora de fibrose cística: _____
- g) nanoduct: _____
- h) Sem exigência mínima
- i) Não sei

3.05- De acordo com o procedimento utilizado para coletar o suor, especifique o limite máximo de massa de suor que você considera aceitável para realizar a análise dos eletrólitos?

- a) Espiral de Macroduct: _____
- b) Gase: _____
- c) Papel filtro: _____
- d) tubo coletor: _____
- e) eletrodo orion de mensuração de cloro: _____
- f) fita indicadora de fibrose cística: _____
- g) nanoduct: _____
- h) Sem exigência máxima
- i) Não sei

3.06- Número de coletas de suor realizadas para fazer um diagnóstico de FC

- a) 1
- b) 2
- c) 3
- d) >3

3.07- Qual o tipo e qual é a marca da balança que você utiliza para pesar o suor coletado?

- a) Balança Eletrônica Analítica e de Precisão (digital), marca: _____
- b) Balança Analítica e de Precisão, marca: _____

3.08- Quantas casas decimais tem a balança que você utiliza para pesar o suor coletado?

- a) 3
- b) 4
- c) 5
- d) > 5

3.09- O que você faz quando a quantidade da amostra de suor é insuficiente para a análise? Assinale todas que você considera.

- a) Repete o procedimento da coleta de suor em outro momento
- b) Continua a coleta de suor até uma quantidade adequada de suor é produzida
- c) Combina uma fração da amostra com outra fração para fornecer a quantidade suficiente
- d) Usa qualquer quantidade de suor que foi coletado e continua com a análise
- e) Outros(especifique) _____

3.10- Em relação a pergunta anterior, caso você opte em repetir o teste do suor em outro momento, qual é o tempo mínimo entre coletas aceito por você?

- a) Logo após o término do primeiro teste
- b) 4 horas após o término do primeiro teste
- c) 12 horas depois do primeiro teste
- d) > 12 horas depois do primeiro teste

3.11- Caso seja necessário em realizar o teste novamente em outro momento, assinale a alternativa que você considere correta.

- a) Sempre no mesmo local que estimulou anteriormente
- b) Nunca no mesmo local que estimulou anteriormente (especifique o novo local eleito para fazer a segunda estimulação): _____
- c) Não me preocupo com o local utilizado anteriormente

3.12- Você utiliza algum método além da estimulação clássica para auxiliar o rendimento do suor?

- a) Envolve o braço do paciente com um cobertor
- b) Pede para o paciente caminhar um pouco
- c) Pede para o paciente ficar exposto ao sol
- d) Envolve o braço do paciente com um cobertor e pede para ele também se expor ao sol
- e) Outros (especifique): _____

4.0- Análise Laboratorial (Dosagem Na/Cl)

4.01- Como é analisado o suor em seu serviço? Indique todos que se aplica

- a) Condutividade usando Wescor Sweat Check
- b) Condutividade usando Wescor Nanoduct
- c) Análise do cloro usando uma análise de multiteste automatizada
- d) Análise do cloro usando um espectrofotometro
- e) Análise do cloro usando um eletrodo de Orion para mensurar a pele
- f) Análise do cloro usando um adesivo indicador de FC
- g) Análise do cloro usando um instrumento de titulação
- h) Análise do cloro usando outros

- i) Análise do sódio usando fotômetro de chama
- j) Análise do sódio usando uma análise de multiteste automatizado
- k) Osmolaridade usando _____
- l) Cloridrômetro digital _____

4.02- Quem é responsável para análise?

- a) A equipe do laboratório
- b) A equipe médica
- c) Outros (especifique) _____

4.03- Como você armazena a amostra de suor e qual a temperatura ideal antes da análise?

- a) temperatura ambiente
- b) Geladeira, temperatura de: _____
- c) Congelador, temperatura de: _____
- d) Não armazeno

4.04- Por quanto tempo você armazena a amostra de suor antes de realizar a dosagem?

- a) Análise imediata
- b) Até 2 dias
- c) Até 3 dias
- d) Até 7 dias
- e) > 7 dias

4.05- Você utiliza controle em toda rotina de análise?

- a) Sim
- b) Não, por quê?: _____

4.06- Quantos controles você utiliza na rotina de análise do sódio?

- a) 1
- b) 2
- c) 3
- d) Outros: _____

4.07- Quantos controles você utiliza na rotina do cloro?

- a) 1
- b) 2
- c) 3
- d) Outros: _____

4.08- Qual controle você utiliza para dosar o sódio?

- a) Comercial, qual? _____
- b) Interno, qual? _____

4.09- Qual controle você utiliza para dosar o cloro?

- a) Comercial, qual? _____
- b) Interno, qual? _____

4.10- Qual o padrão e a marca utilizado para validar a dosagem de sódio e cloro?

- Sódio- padrão: _____ marca: _____
- Cloro- padrão: _____ marca: _____

4.11- Qual o intervalo de referencia para o suor?

a) Cloro
Negativo: _____
Limítrofe: _____
Positivo: _____

b) Sódio
Negativo: _____
Limítrofe: _____
Positivo: _____

c) Condutividade
Negativo: _____
Limítrofe: _____
Positivo: _____

d) Não sei

4.12- Em que ocasião você considera necessário repetir o teste?

- a) Nunca
- b) Teste limítrofe
- c) Quantidade de suor insuficiente para realizar a dosagem
- d) Dosagem com diferença muito grande entre o cloro e sódio
- e) Outros, especifique: _____
- f) Dosagem de sódio maior do que a dosagem do cloro

4.13- Você participa de um programa que avalia a qualidade do seu teste?

- a) Não
- b) Sim

Como: _____ Quem realiza essa
avaliação? _____

4.14- Quem é responsável pelo laudo?

- a) ausência de um relatório escrito
- b) equipe do laboratório
- c) equipe médica
- d) outros (especifique): _____

Apêndice F – Suplemento 4

Métodos Suplementares - Teste do Suor

O teste é realizado com duração total de cerca de 40 minutos. Inicia-se com a limpeza da pele com gaze embebida com água bidestilada seguindo-se a secagem da pele com gaze; é colocada uma gaze umedecida com solução de pilocarpina no antebraço do paciente e sobre ela é fixado um eletrodo. Distanto cerca de 3-4 cm do primeiro eletrodo, é colocada outra gaze umedecida com ácido sulfúrico e sobre ela um segundo eletrodo. Os eletrodos são ligados no aparelho gerador da corrente, sendo que o fio vermelho deve ser acoplado no eletrodo que foi colocado a pilocarpina (polo positivo). A corrente deve ser controlada para não ultrapassar 4 mA e a estimulação deve ser feita durante 5 minutos. A gaze estéril cortada em 3x3cm, ou papel de filtro com a mesma medida, devem ser previamente pesados em balança semi-analítica dentro de um frasco estéril, seguida de anotação do peso seco. Deve-se utilizar pinça para a manipulação do papel ou da gaze evitando aderência do próprio suor no material da coleta. Após o tempo correto de estimulação o equipamento deve ser desligado, os eletrodos desconectados e as gazes retiradas. Limpar novamente o local da estimulação com água deionizada e secar com outra gaze seca; colocar o material de coleta sobre a pele, sobre o local que foi estimulado com pilocarpina (polo positivo) e cobrir com plástico transparente. Fixar com fita adesiva. Aguardar a produção do suor durante no máximo 30 minutos; retirar a gaze ou papel embebido de suor com uma pinça e colocar no mesmo frasco previamente identificado e pesado (o frasco deve ser bem vedado para evitar evaporação do suor para não alterar a sua concentração); pesar novamente o frasco com a gaze embebida de suor em balança semi-analítica, que deve ter precisão de quatro casas decimais, e anotar o peso total; a diferença entre a pesagem antes e depois da coleta fornece o peso da amostra de suor; pipetar 5 ml de água deionizada e adicionar dentro do frasco com a gaze com o suor. Tampar e manter o frasco em geladeira por no máximo 3 dias. Fazer a dosagem do Cl^- por titulometria manual ou coulometria (cloridrômetro). Este procedimento deve ser realizado em duplicata (não obrigatório). No caso de duplicata, as amostras são consideradas uma única coleta. Para um segundo teste deve ser marcado um outro momento. Não deve ser realizado em RN, nascidos à menos de 48 horas, em pacientes com febre e com lesões de pele.

Na glândula sudorípara normal a estimulação adrenérgica induz um fluxo isosmolar de suor com a ativação da CFTR e da ENaC (canal de Na^+) responsáveis pela reabsorção de Cl^- e Na^+ respectivamente, além de água. Resulta no fluxo de um pequeno volume de suor contendo,

em média, 16 mmol / L de Cl^- e 23 mmol / L de Na^+ (Di Sant'Agnese et al., 1953; di Sant'Agnese & Powell, 1962). Em pacientes com FC, não há a reabsorção de Cl^- e Na^+ e o suor tem concentrações aumentadas destes íons. Em indivíduos acima de dois anos as concentrações de Cl^- acima de 60 mmol/L são consideradas anormais (Farrell & Kosciak, 1996) e valores entre 40 mmol/L e 60 mmol/L são *borderline* (Taylor, Hardcastle, & Southern, 2009). Para as crianças menores de dois anos os valores considerados negativos são < 30 mmol/L, duvidosos entre 30 mmol/L e 60 mmol/L.

A dosagem do Na^+ é um controle de qualidade do teste. A diferença entre a dosagem de Na^+ e Cl^- não deve ultrapassar 20 mEq/ L e a relação cloro/sódio deve ser sempre maior que um. Uma concentração de cloro maior que 160 mEq/L é fisiologicamente impossível sugerindo erro na coleta ou na dosagem.

Com os conhecimentos atuais sobre a fisiopatologia e genética sabe-se que a FC é um “espectro de doença” cujo fenótipo reflete o grau de atividade da CFTR. O TS pode não espelhar esta atividade em alguns casos e mesmo o estudo molecular isolado, muitas vezes não é suficiente para o diagnóstico da FC, sendo necessários outros métodos auxiliares para a sua confirmação (Moskowitz et al., 2008; Quinton et al., 2012).

8. ANEXOS

ANEXO A

PARECER COMITÊ DE ÉTICA – BIÓPSIA RETAL



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 23/03/11
(Grupo III)

2ª VIA

PARECER CEP: Nº 503/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0386.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE REGULADOR (CFTR- CANAL DE CLORO) EM BIÓPSIAS RETAIS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Antonio Fernando Ribeiro

INSTITUIÇÃO: Departamento de Pediatria e Genética Médica / FCM / UNICAMP.

APRESENTAÇÃO AO CEP: 19/07/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/07/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Promover o envolvimento multidisciplinar a fim de se entender os mecanismos da Fibrose Cística para que se possa desenvolver e testar novas terapias direcionadas para mutações específicas da doença.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto de pesquisa em genética humana, com cooperação estrangeira e com menores de 18 anos. Através de uma parceria entre a Unicamp e a Universidade de Lisboa pretende-se implantar na Unicamp a utilização da micro-câmara de Ussing para estudos de eletrofisiologia em pacientes brasileiros com Fibrose Cística. O treinamento de recursos humanos será feito em Lisboa e o grupo português viria ao Brasil para trazer o equipamento para a realização dos testes. Estes serão detecção molecular em amostra de sangue periférico, de análise de expressão de RNAm de células epiteliais nasais e por biópsia de mucosa retal para estudos eletrofisiológicos. Todos os resultados serão entregues aos pacientes que receberão também aconselhamento genético. Serão 30 sujeitos de pesquisa com HD de Fibrose Cística que ainda não tenham o diagnóstico de confirmação. Os critérios de inclusão estão definidos e se autorizado material biológico será armazenado no Banco do Laboratório de Genética Molecular. Não haverá nenhum ressarcimento aos pacientes.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O pesquisador se compromete a seguir os regulamentos para utilização desses dados. O projeto tem método, objetivos coerentes e adequado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de julho de 2007.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO B
TERMO DE CONSENTIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA – PÓS – GRADUAÇÃO

Esclarecimento e consentimento do(a) doente:

Ex^{mo(a)} Senhor(a),

A Equipe Multidisciplinar do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), (Dr^o Antônio Fernando Ribeiro – chefe de Ambulatório de FC; Dr^a. Maria de Fátima Servidoni – Gastropediatra; Dr^a Carmen Sílvia Bertuzzo – Geneticista; Adriana Mendes Vinagre – pós-graduanda) em colaboração com o Grupo de Investigação em Fibrose Cística do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge de Lisboa (Portugal) (Prof^a Margarida Amaral – Investigadora Principal; Marisa Sousa – pós-graduanda) e médicos e investigadores da Universidade de Regensburg (Prof. Karl Kunzelmann – Médico Fisiologista) pretende realizar um estudo sobre a doença Fibrose Cística (FC), para esclarecer alguns aspectos ainda pouco entendidos desta doença.

Para tal, pedimos a sua colaboração. Pretendemos assim, efetuar uma análise utilizando sangue, algumas células do seu epitélio intestinal (obtidas por biópsia retal) e também algumas células do epitélio nasal (obtidas por escovado nasal). Estas análises, que são pouco invasivas e praticamente indolores, destinam-se à obtenção/confirmação do diagnóstico FC, e também para um possível prognóstico da doença (poderá obter mais informações na folha em anexo).

Responsabilizamo-nos em cumprir as normas da confidencialidade como é usual, isto é, não iremos transmitir estes dados a terceiros, mas comprometemo-nos a transmitir-lhe os resultados que sejam do seu interesse. A sua decisão em participar ou não neste estudo não terá qualquer influência no tratamento.

Declaração

Concordo em participar no 'Estudo de Fibrose Cística por medição da diferença de potencial (ddp) no epitélio intestinal e nasal', com a coleta das amostras acima referidas (biópsias retais e escovado nasal) e com coleta de sangue (para pesquisa genética de mutações) e com o seu uso em investigação. Também autorizo os investigadores acima mencionados a terem acesso aos meus dados clínicos. Tomo conhecimento que é pouco provável os resultados desta investigação virem a ter qualquer efeito clínico directamente aplicável na minha pessoa. Fico com uma cópia desta declaração. Fui informado, que poderei em qualquer altura vir a revogar este consentimento.

Data e assinatura (doente) e RG.

ANEXO C

Escore Clínico de Shwachman & Kulczycki

Pontuação	Atividade Geral	Pontuação	Achados Radiológicos
25	Atividade normal plena: joga bola; vai à escola normalmente.	25	Campos Pulmonares limpos.
20	Falta Resistência e cansa ao final do dia; boa frequência escolar	20	Mínimas Marcas de acentuação broncovascular; enfisema primário.
15	Descansa voluntariamente durante o dia; cansa facilmente após o exercício.	15	Enfisema leve; sinais de atelectasias; marcas de aumento broncovascular.
10	Repousa muito; dispnéia depois de caminhada curta.	10	Enfisema moderado; áreas de atelectasias difusas com áreas de infecção sobrepostas.
5	Ortopnéia; confinado à cama ou cadeira.	5	Extensivas alterações com fenômeno pulmonar obstrutivo e infecção; atelectasias lombares e bronquiectasias.
25	Mantém peso e altura próximos do percentil 25; bom tônus e massa muscular; fezes bem formadas (quase normais).	25	Normal: sem tosse; FC e FR normais; pulmões limpos; boa postura.
20	Peso e altura aproximadamente no percentil de 15 a 20; fezes levemente anormais; tônus e massa muscular satisfatórios.	20	Tosse rara ou "pigarro"; FC e FR normais no repouso; mínimo enfisema; pulmões limpos; sem baqueteamento.
15	peso e altura acima do percentil 3; fezes usualmente anormais, volumosas e pobremente formadas; tônus pobre e massa muscular reduzida; pouca distensão abdominal (se tiver).	15	Tosse ocasional (ao levantar pela manhã); FR levemente elevada; enfisema suave; MV rude; roncos localizados raramente; baqueteamento precoce.
10	Peso e Altura abaixo do percentil 3; fezes pouco formadas, volumosas, ofensivamente gordurosas, músculo fraco e massa reduzida, distensão abdominal suave ou moderada.	10	Tosse frequente, usualmente produtiva; retração torácica; enfisema moderado; deformidade torácica; roncos usualmente presentes; baqueteamento 2/3.
5	Marcada má-nutrição, protuberância abdominal abundante, fezes frequentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas; prolapso retal frequente.	5	Tosse grave paroxística; taquipnéia e taquicardia; alteração pulmonar extensa; sinais de falência cardíaca direita; 3/4 baqueteamento.
Classificação		Pontos	
Grave		≤ 40	
Moderado		55 – 41	
Leve		70 – 56	
Bom		85 – 71	
Excelente		100 – 86	

Fonte
:
Artigo
o
origi
nal
de

Schwachman & Kulczycki, 1958.

ANEXO D

PARECER COMITÉ DE ÉTICA – TESTE DO SUOR

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS
CAMPINAS)



PROJETO DE PESQUISA

Título: Teste do suor: O panorama atual dos serviços Brasileiros de diagnóstico de Fibrose Cística

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06648412.7.0000.5404

Pesquisador: CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP
(Campus Campinas)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 86624

Data da Relatoria: 28/08/2012

Apresentação do Projeto:

O teste do suor é considerado por grupos de consenso como o "padrão ouro" para o diagnóstico de Fibrose Cística (FC). O estudo será transversal, do tipo observacional. Serão avaliados por meio de um questionário sobre os procedimentos do teste do suor via telefone em 25 serviços de diagnóstico de FC do Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo: Pesquisar sobre os procedimentos do teste do suor realizados atualmente no Brasil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta nenhum risco para os participantes. Os benefícios oferecidos por esta pesquisa são aplicáveis a toda comunidade científica, por meio da publicação e divulgação dos resultados, tomando possível conhecer como estão sendo realizados os testes do suor em cada serviço selecionado para diagnosticar a FC.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto simples mas bem estruturado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8938

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS
CAMPINAS)



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 31 de Agosto de 2012

Assinado por:
Carlos Eduardo Steiner

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO E - FICHA CLÍNICA

		EVAPORIMETER & RECTAL BIOPSY CIPED – LAFIP/LARC ESTUDOS COMPLEMENTARES DE FIBROSE CÍSTICA – FOLHA DE INQUÉRITO	
Nome:			
Data de nascimento:	_/_/	Gênero: Feminino ☐ Masculino ☐	Idade no diagnóstico FC:
Genótipo		Íleo meconial ou DIOS	Desidratação
História Familiar:	Sim ☐ Não ☐		
Familiares afetados:	Pai ☐ Idade: Mãe ☐ Irmã ☐ Irmão ☐	Genótipos:	Desenvolvimento: Peso Altura
Funcionamento pancreático:	IP ☐ SP ☐	Teste elastase fecal: leitura/resultado (µg/g fezes) Idade em que começou a IP:	Teste de suor (mEq/l): (Cl / Na ⁺)
Doença Hepática:			
Diabetes:		Polipose Nasal Sim ☐ Não ☐	
Escore de Shwachman-Kulczycki:			
Função Pulmonar:	VEF ₁ % CVF % VEF ₍₂₅₋₇₅₎ Bronquiectasia, cistos, obstrução, etc	Radiologia Sim ☐ Não ☐	Evolução da função pulmonar:
Colonização pulmonar por bactérias:		Idade	
Outras características clínicas: (desnutrição, disfunção hepática ou cardíaca, diabetes, infertilidade, etc.)			
IP - Insuficiência pancreática SP - suficiência pancreática	Pa - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bc - <i>Burkholderia cepacia</i>	Hi - <i>Haemophilus influenza</i> Sa - <i>Staphylococcus aureus</i>	
Biopsia Retal	Resultado (FC: FC-res; Não-FC: Inconc.)	Quantificação Função CFTR	
Evaporímetro:			
Médico: _____	Data: _____	Página 1	

ANEXO F – CARTA CONVITE CENTROS – TESTE DO SUOR



CARTA CONVITE

Prezado Colega

Estamos interessados em realizar uma pesquisa sobre os procedimentos que envolvem a coleta de sódio e cloro no suor nos serviços de diagnóstico e de atendimentos em Fibrose Cística no Brasil. Para isso estamos encaminhando em anexo um questionário que gostaríamos de aplicá-lo ao profissional técnico responsável pelo serviço de coleta de suor em seu serviço.

O questionário é composto de 49 perguntas. Não existe resposta certa ou errada e o que o serviço realiza é o que deve ser respondido.

Ressaltamos que cada serviço será identificado com um número e os serviços não receberão as respostas dos outros serviços, que serão mantidos em sigilo.

Caso haja publicação decorrente desta pesquisa, cada centro terá um co-autor no trabalho científico e todos os serviços serão citados no texto científico resultante da pesquisa.

O trabalho já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação de seu serviço encontra-se anexo.

Sendo o que se apresenta para o momento

Agradecemos atenção dispensada

Atenciosamente

Maria de Fátima Côrrea Pimenta Servidoni
Carla Cristina Souza Gomez
Adriana Mendes Vinagre
Francisco Ubaldo Vieira Junior
José Dirceu Ribeiro
Antônio Fernando Ribeiro

ANEXO G



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

Teste de suor para fibrose cística: O panorama atual dos serviços de diagnóstico de Fibrose Cística do Estado de São Paulo

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Eu _____, (chefe do serviço), portador do RG _____ telefone _____ residente na rua _____ bairro _____ cidade _____ por livre espontânea vontade permito a participação do serviço de diagnóstico em FC _____ (nome do local).

Este projeto investiga por meio de um questionário como os procedimentos do teste de suor para o diagnóstico de Fibrose Cística são realizados neste serviço.

Os pacientes fibrocístico apresentam um transporte anormal de íons o que promove uma concentração elevada de cloreto e de sódio no suor, o teste do suor é considerado por grupos de consenso como o “padrão ouro” para o diagnóstico de FC.

Os resultados ficaram em absoluto sigilo, estando somente disponível para pesquisa, vale esclarecer que a pessoa participante poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo após a assinatura deste termo.

Sei que com este estudo não receberei nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados.

Autorizo a aplicação deste questionário e depois, poderei ser comunicado sobre os resultados, como retribuição por esta prestação de serviço e caso este trabalho venha ser publicado terei meu nome publicado como co-orientação e colaboração no trabalho. Sei que em qualquer parte deste estudo poderei ter acesso aos pesquisadores desta pesquisa para resolver qualquer dúvida. Além disso, sei que receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por mim assinado.

Declaro que li esse documento e sempre que tiver alguma dúvida sobre esse estudo, serei prontamente esclarecido sobre o mesmo pelos pesquisadores.

Nome do responsável pelo serviço: _____

e-mail: _____ telefone: _____

Assinatura do responsável pelo serviço

Nome do responsável pelo laboratório: _____

e-mail: _____ telefone: _____

Assinatura do responsável pelo laboratório

Nome do responsável em realizar o TS: _____

e-mail: _____ telefone: _____

Assinatura do responsável em realizar o teste do suor

Pesquisadores Responsáveis:

Carla Cristina Souza Gomez	Telefone: 19- 3521 8983
Dra. Maria de Fátima Servidoni	Telefone: 19- 3521 8983
Prof.Dr. Antônio Fernando Ribeiro	Telefone: 19-3521 8983
Prof.Dr.José Dirceu Ribeiro	Telefone: 19-3521 8983
Prof.Dr.francisco Ulbado	Telefone: 19-3521 8983
Dra.Biol. Adriana Vinagre Mendes	Telefone: 19- 35218983

Em caso de duvida sobre essa pesquisa oriento que entre em contato com o Comitê de Ética pelo telefone 35217187.

ANEXO H

CERTIFICADOS DE PARTICIPAÇÃO DE TRABALHOS EM CONFERÊNCIAS

EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CLORURO DE LA CFTR EN BIOPSIAS RECTALES HUMANAS

^{2,3}Marisa Sousa, ¹Maria F Servidoni, ¹Luciana C Bonadia, ¹Adriana M Vinagre, ¹Carmen Bertuzzo, ⁴Karl Kunzelmann, ^{2,3}Margarida D Amaral, ¹Antônio F Ribeiro

¹FCM-Unicamp, Campinas, Brazil.

²DG-INSA, Lisboa, Portugal.

³DQB-FCUL, Lisboa, Portugal.

⁴IP-UR, Regensburg, Germany.

Los mecanismos moleculares que regulan el canal CFTR, generador de la secreción de cloruro (Cl⁻), han sido estudiados por mediciones en cámaras de Ussing en biopsias rectales de pacientes con fibrosis quística (FQ) [1-5]. La accesibilidad a las muestras del recto y las correlaciones observadas entre la secreción transepitelial de Cl⁻ y el fenotipo clínico de la FQ son muy prometedores para el diagnóstico, el pronóstico de la FQ y, más recientemente, también para validación de nuevas terapias destinadas a corregir el defecto básico de la FQ.

El objetivo del presente estudio es cuantificar la secreción de Cl⁻ del canal CFTR en biopsias rectales obtenidas de pacientes FQ con diferentes genotipos y fenotipos clínicos.

La secreción de Cl⁻ del CFTR, dependiente del cAMP, se determinó en biopsias rectales de 68 individuos con sospecha de FQ, como se describió previamente [4-5], y se clasificaron los individuos en tres grupos. En el primero grupo (I) de individuos, se observó la secreción de Cl⁻ dependiente de cAMP ($I_{sc} = -92,7 \pm 26,7 \mu A/cm^2$) después de la estimulación con IBMX/forskolina (I/F) y la activación co-colinérgica con carbachol (CCH). En estos individuos se excluyó la FQ (n = 31). Por otra parte, en el segundo grupo (II), no se encontró secreción de Cl⁻ inducida por el cAMP y se observaron respuestas lumen positivas ($I_{sc} = 32,3 \pm 5,3 \mu A/cm^2$), lo que refleja la secreción de potasio (K⁺). Estos individuos (n = 29) se consideraran con diagnóstico de FQ. En el tercer grupo (III) se detectaron respuestas de secreción residual de Cl⁻ después de la estimulación con I/F/CCH ($I_{sc} = -19,1 \pm 4,2 \mu A/cm^2$). Estos individuos, que tenían fenotipos clínicos más leves (n = 8) se consideraran con diagnóstico de FQ mas suave.

Estos resultados ayudan a establecer el método de medición de la secreción de Cl⁻ mediada por el CFTR como un método sensible para el diagnóstico y el pronóstico de la FQ. Por otra parte, este enfoque nos permite identificar los pacientes de FQ con la actividad residual del CFTR que pueden beneficiarse de nuevas terapias, incluyendo el uso de potenciadores.

Trabajo apoyado por la beca TargetScreen2 (EU-FP6-LSH-2.005-037.365) PIC/IC/83103/2007, financiación de BioFig (FCT, Portugal), FAPESP y FAEPEX (Unicamp, Brasil). MS tiene la beca de doctorado SFRH / BD / 35936/2007 (FCT, Portugal).

[1]Veeze HJ et al (1991) Gastroenterology 101: 398-403.

[2]Veeze HJ et al (1994) JCI 93:461-466.

[3]Berschneider HM et al (1988) FASEB J 2:2625-2629

[4]Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

[5]Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.

Trabajo de investigación - presentación oral

Estimado doctor:

Su trabajo **EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CLORURO DE LA CFTR EN BIOPSIAS RECTALES HUMANAS** ha sido aceptado para ser presentado de forma oral. El horario estipulado es de 15:40 a 15:50, el día viernes 20, en el salón Bolívar A. Usted contará con 7 minutos para exponer su trabajo y 3 minutos para preguntas del público.

Si tiene alguna duda comuníquese con nosotros.

Cordialmente,

*Comité de investigación
Congreso SOLANEP*



Evaluación de la Secreción de Cloruro de la CFTR en Biopsias Rectales Humanas

Marisa Sousa, Maria F Servidoni, Luciana C Bonadia, Adriana M Vinagre, Carmen Bertuzzo, Karl Kunzelmann, Margarida D Amaral, Antônio F Ribeiro

UNICAMP, Campinas (Brazil)

AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CLORETO PELO CFTR EM BIÓPSIAS RETAIS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

^{1,2}Marisa Sousa, ⁴Maria F Servidoni, ³Luciana C Bonadia, ³Adriana M Vinagre, ⁴Silvia R Cardoso, ³Arthur Kmit, ^{1,2}Anabela S Ramalho, ³José D Ribeiro, ³Carmen S Bertuzzo, ^{3,4}Antônio Fernando Ribeiro, ⁵Karl Kunzelmann, ^{1,2}Margarida D Amaral

1. Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.
2. Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
3. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.
4. Hospital das Clínicas, Serviço de Endoscopia Pediátrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.
5. Institut für Physiologie, Universität Regensburg, Regensburg, Germany.

Os mecanismos moleculares da regulação do canal CFTR na secreção electrogênica de cloreto têm sido estudados por medições em câmaras de Ussing, utilizando biópsias retais de indivíduos com Fibrose Cística (FC) [1-3].

O objetivo do presente estudo foi quantificar e correlacionar a secreção de cloreto mediada pela CFTR em biópsias retais de doentes suspeitos de FC, com diferentes genótipos e fenótipos clínicos.

A secreção de cloreto mediada pela CFTR foi medida em 68 indivíduos, como anteriormente [3-4], permitindo classificá-los em três grupos. No primeiro grupo de indivíduos (n=31) foi excluída a FC, pois observámos secreção de cloreto dependente do cAMP via CFTR ($\Delta I_{sc} = -92.7 \pm 26.7 \mu A/cm^2$) após estimulação com IBMX/Forskolina e co-activação colinérgica com carbachol. O segundo grupo foi diagnosticado como FC (n=29), pois se observaram respostas lúmen-positivas ($\Delta I_{sc} = 32.3 \pm 5.3 \mu A/cm^2$), refletindo secreção de potássio e não cloreto. O terceiro grupo foi diagnosticado como FC mais suave (n=8), pois além de fenótipos clínicos mais leves, foi detectada secreção de cloreto residual ($\Delta I_{sc} = -19.1 \pm 4.2 \mu A/cm^2$).

Estes resultados contribuem para estabelecer a medição de secreção de cloreto pelo CFTR em biópsias retais como um método sensível para o diagnóstico e prognóstico da doença FC. Mais ainda, esta abordagem permite identificar pacientes FC com atividade residual de CFTR que podem beneficiar de novas terapias.

Trabalho suportado por: TargetScreen2 (EU-FP6-LSH-2005-037365), PIC/IC/83103/2007 (FCT, Portugal) e BioFIG (FCT, Portugal), FAEPEX e FAPESP (Unicamp, Brasil). MS tem bolsa de Doutorado SFRH/BD/35936/2007 (FCT, Portugal).

[1]Veeze HJ et al (1991) Gastroenterology 101:398-403.

[2]Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

[3]Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.



CERTIFICADO

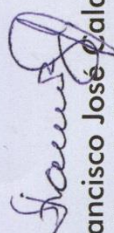
Certificamos que

Marisa Sousa, Maria de Fátima Servidoni; Luciana Cardoso Bonadia; Adriana Mendes Vinagre; Silvia Regina Cardoso; Arthur Kmit; Anabela Santo Ramalho; José Dirceu Ribeiro; Carmen Silvia Bertuzzo; Antônio Fernando Ribeiro; Karl Kunzelmann; Margarida Duarte Amaral

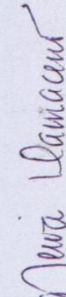
participou do III CONGRESSO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA,
realizado na Associação Médica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais,
no período de 01 a 04 de setembro de 2010, na qualidade de

Autor(es) do Tema Livre 021, com o título: AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO DE CLORETO PELO CFTR EM BIÓPSIAS RETAIS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Belo Horizonte, 04 de Setembro de 2010



Francisco José Galdeira Reis
 Presidente do III Congresso Brasileiro de Fibrose Cística



Neiva Damaceno
 Presidente do GBEFC



Especialidade: PEDIATRIA = 10.0
 Especialidade: PNEUMOLOGIA = 10.0
 Especialidade: GENÉTICA MÉDICA = 10.0
 Especialidade: GASTROENTEROLOGIA = 10.0
 Área de atuação: GASTROENTEROLOGIA = 10.0
 PEDIÁTRICA = 10.0
 Área de atuação: NUTROLOGIA PEDIÁTRICA = 10.0



ASSESSMENT OF CFTR Cl^- SECRETION IN HUMAN COLON AND EFFICACY OF F508DEL-CFTR CORRECTORS IN HUMAN NATIVE TISSUES

^{1,2}Marisa Sousa, ³Maria de Fátima Servidoni, ³Adriana Mendes Vinagre, ³Luciana C Bonadia, ³Silvia Regina Cardoso, ³Arthur Kmit, ^{1,2}Anabela Santo Ramalho, ³Carmen Bertuzzo, ³Antônio Fernando Ribeiro, ⁴Karl Kunzelmann, ^{1,2}Margarida D Amaral

¹DG-INSA, Lisboa, Portugal.

²DQB-FCUL, Lisboa, Portugal.

³FCM-Unicamp, Campinas, Brazil.

⁴IP-UR, Regensburg, Germany.

Keywords: CFTR-mediated Cl^- transport, CF diagnosis, small molecule, CFTR function, membrane trafficking.

CATEGORY: NEW THERAPIES

Recent high-throughput screens identified several novel small molecules with potential to treat the basic defect in CF. These include correctors (like VRT-325 and C4) that partially rescue the trafficking defect of F508del-CFTR and potentiators (like VRT-532 and VX-770) that correct the gating defect of G551D-CFTR [1-3]. However, the action and efficacy of these compounds on native human tissues remains to be determined. We recently screened a 250 small-molecule library by quantitative Western blot in CFBE cells and F508del-NBD1 folding by differential scanning fluorimetry [4]. Among the 4 primary lead "hit" corrector compounds is TS-01-02-A3.

Here, we performed ion transport studies on native colonic biopsies from CF patients mounted on Ussing chambers. Our aim is two-fold: to quantify CFTR-mediated Cl^- secretion in rectal biopsies from CF patients with different CFTR genotypes for clinical diagnosis and prognosis; and to assess the efficacy of the above correctors directly in human native tissues *ex vivo*.

CFTR cAMP-mediated Cl^- secretion was measured in freshly excised rectal biopsies from 68 individuals, as previously [5-6] and allowed their classification into 3 groups. In the non-CF individuals group (n=31), we observed cAMP-dependent Cl^- secretion ($\Delta\text{Isc} = -92.7 \pm 26.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) upon stimulation with IBMX/Forskolin (I/F) and co-cholinergic activation with carbachol (CCH). In contrast, in one group (I) of CF patients (n=29), the cAMP-induced Cl^- secretion was absent and lumen-positive responses ($\Delta\text{Isc} = 32.3 \pm 5.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), reflecting K^+ secretion, were detected. In another group (II) of CF patients with milder clinical phenotypes (n=8), residual Cl^- secretory responses were detected upon I/F/CCH stimulation ($\Delta\text{Isc} = -19.1 \pm 4.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

The same biopsies used to confirm/exclude a CF diagnosis, were used to test the effects of 6.7 μM VRT-325, 10 μM C4 and 10 μM TS-01-02-A3 after 8h incubation. Preliminary results in biopsies from F508del/F508del patients did not evidence a clear effect for VRT-325 and C4 correctors, but showed a modest effect for TS-01-02-A3. Ongoing work involves testing of efficacy of the above primary lead correctors on native tissues with longer incubation times (up to 16h) in parallel with primary cultures of human airway cells.

These results help to further establish rectal biopsy measurements (namely CFTR-mediated Cl^- secretion) as a sensitive method for the diagnosis and prognosis of CF disease. Moreover, this approach can also identify CF patients with residual CFTR activity who can thus benefit from potentiators therapy.

Work supported by TargetScreen2 (EU-FP6-LSH-2005-037365), PIC/IC/83103/2007 grants, BioFig(FCT, Portugal, FAEPEX and FAPESP funding (Unicamp, Brazil). MS is recipient of SFRH/BD/35936/2007 PhD fellowship (FCT, Portugal). Authors are grateful to CFRT (USA) for making small molecules available.

[1]Pedemonte N et al (2005) JCI 115:2564-2571.

[2]Van Goor F et al (2009) PNAS 106:18825-30.

[3]Van Goor F et al (2006) AJPLCMP 290:L1117-30.

[4]Palma M et al (2010) ECFS-BSC, Carcavelos (Portugal), Abs 43.

[5]Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.

[6]Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

effects, with the 280 mg dose appearing to be the minimum effective dose; and the 560 mg dose showing statistically significant improvements in clinical symptoms, microbiologic activity, and sustained improvement in lung function for up to 28 days post-study drug. These data warrant confirmation of safety and efficacy of Arikace™ in Phase 3 trials of CF patients chronically infected with Pa.

228★

STANDARDIZATION OF METHODS FOR MEASURING MUCOCILIARY AND COUGH CLEARANCE

Bennett, W.D.¹; Laube, B.L.²; Corcoran, T.E.³; Zeman, K.¹; Sharpless, G.²; Thomas, K.³; Wu, J.¹; Mogayzel, P.²; Pilewski, J.³; Donaldson, S.H.¹ *1. University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA; 2. Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD, USA; 3. University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA*

Background: The methodology for measuring mucociliary (MCC) and cough clearance (CC) needs to be standardized between CF centers to allow for its future use as an effective non-invasive, outcome measure of CF therapeutics. A standardization protocol has been developed at the University of North Carolina at Chapel Hill, NC (UNC), Johns Hopkins University (JHU), and the University of Pittsburgh (UP).

Methods: Healthy adult subjects inhaled an aerosol (mass median aerodynamic diameter = 5.0 µm) generated by a Devilbiss #646 nebulizer from a solution containing the radioisotope ^{99m}technetium sulfur colloid in 0.9% saline. Subjects inhaled the radiolabeled aerosol at 500 ml/sec by following a metronome and flow signal from a commercial dosimeter. Following inhalation, subjects sat in front of a gamma camera, as sequential lung images were acquired for 60 min. Subjects then coughed 60 times and images were acquired after each set of 20 coughs, i.e. at 70, 80 and 90 min. Subjects returned to the laboratory 24 hours later for a final image of residual lung activity. Initial aerosol distribution was measured as a central/peripheral (C/P) ratio of activity. MCC for the right lung was expressed as the average of % clearance over the 60 min (Ave60Clr). MCC/CC was expressed as the average of % clearance over the 90 min (Ave90Clr).

Results: A multivariate analysis of clearance vs. time with site and C/P as covariates showed no significant site-specific differences. Ave60Clr (± standard deviation) was similar at the three sites with 8±8%, 11±6% and 10±9% at UNC (n=30), JHU (n=10) and UP (n=10), respectively. Ave90Clr was also similar with 11±9%, 16±8% and 14±10% at UNC, JHU and UP, respectively. Mean clearance at 24 hours was 39±14%, 36±18% and 45±25% at UNC, JHU and UP, respectively. The initial aerosol distribution was similar at all three sites with C/P ratios averaging 1.63±0.43, 1.81±0.62 and 2.04±0.55 at UNC, JHU and UP, respectively. Interestingly, MCC and MCC/CC was greater in females (n=19) vs. males (n=31), with Ave60Clr =13±10% and 7±5%, respectively (p=0.01) and Ave90Clr 16±11% and 10±7%, respectively (p=0.03). There were no gender differences for either C/P ratio or 24-hour clearance.

Conclusions: Using these standardized methods, we found that MCC and MCC/CC were similar in healthy adult subjects studied at the three sites. In addition, clearance was significantly faster in females over the 60 and 90 min periods suggesting a gender difference in large airway clearance. Though the reason for this gender difference is not clear, it has implications for the design of future studies, e.g. the number of female and male subjects should be matched in all study cohorts. This standardization protocol may prove beneficial in multi-center trials for testing new therapies that are designed to improve MCC and MCC/CC, allowing more subjects to be studied in a shorter period of time and thus bringing new therapies to patients more rapidly.

This study was funded by the Cystic Fibrosis Foundation.

229★

HIGH-DIMENSIONAL BIOMARKER DISCOVERY IN BAL FLUID FROM PEDIATRIC CF PATIENTS USING SOMAMER TECHNOLOGY

Harris, J.K.¹; Wolfson, A.²; Walker, J.²; Wagner, B.¹; Deterding, R.¹; Sagel, S.D.¹; Accurso, F.J.¹ *1. Pediatrics, University of Colorado Denver, Aurora, CO, USA; 2. SomaLogic, Inc., Boulder, CO, USA*

Background: Validated biomarkers are urgently needed to advance care and research in cystic fibrosis (CF) lung disease. Most validated biomarkers in use are circulating proteins. However, due to the technological challenges of profiling the circulating proteome, particularly inaccessibility of low abundance proteins, the discovery of new protein biomarkers has been limited. Proteomic analysis from the airways should reflect pathways important to lung disease. SOMAMers are specific high affinity nucleic acids-based reagents selected to recognize human protein targets that provide access to the low abundance proteome developed to study the circulating proteome. Here we show this analytical platform is capable of measuring protein levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF).

Methods: BALF was collected for clinical indications in patients with CF (n=5), Surfactant dysfunction mutations (SDM; n=5), Neuroendocrine Cell Hyperplasia of Infancy (NEHI; n=5), and disease controls (DC; n=8). A pilot project was performed to determine if a high-throughput multiplexed SOMAMer-based proteomics platform, measuring 811 proteins, could be applied to BALF. An analysis of variance model was fit to each of the 811 proteins individually to test the association across disease groups. The molecular function ontology for the significant proteins was investigated for over-represented groups. Principal component analysis was used to reduce the dimensionality of the protein profile for the 5 CF patients.

Results: There were 393 proteins significantly increased in the CF group compared to DC (p<0.01). The 457 proteins that were significantly different in CF from the other disease groups were over-representative for signaling molecule and growth factor molecular functions. Proteins commonly studied in CF (including IL-6, IL-8, TIMP-1 and elastase) are distinguishable across disease groups, however, they are ranked below other proteins that better distinguish CF. The 811 proteins were reduced to the first two principal components, which captured 80% of the variability in the protein profiles across the CF patient samples. Based on this information, 2 of the 5 CF patients had a distinctive protein profile from the other 3. Interestingly, the two divergent samples, with lower protein levels, did not grow bacterial pathogens. Determining whether this difference in protein profiles is clinically meaningful, such as predicting future FEV decline would be very valuable.

Conclusion: The pathogenesis of CF is dramatically different from other pediatric lung diseases and even within CF, as determined by profiles of 811 proteins. This technology expands the pool of candidate biomarkers which may prove to be more useful than commonly measured proteins. These data may provide insight into the variations of disease prognosis and suggest novel therapeutic targets.

230★

ASSESSMENT OF CFTR CL⁻ SECRETION IN HUMAN COLON & EFFICACY OF F508DEL-CFTR CORRECTORS IN HUMAN NATIVE TISSUES

Sousa, M.^{1,2}; Servidoni, M.D.³; Vinagre, A.M.³; Bonadia, L.³; Cardoso, S.R.³; Kmit, A.³; Ramalho, A.S.^{1,2}; Bertuzzo, C.S.³; Ribeiro, A.F.³; Kunzelmann, K.⁴; Amaral, M.D.^{1,2} *1. DG, INSA, Lisboa, Portugal; 2. DQB, FCUL, Lisboa, Portugal; 3. FCM, Unicamp, Campinas, Brazil; 4. IP, UR, Regensburg, Germany*

Recent high-throughput screens identified several novel small molecules with potential to treat the basic defect in CF. These include correctors (like VRT-325 & C4) that partially rescue the trafficking defect of F508del-CFTR and potentiators (like VRT-532 & VX-770) that correct the gating defect of G551D-CFTR [1-3]. However, the action and efficacy of these compounds on native human tissues remains to be determined.

We recently screened a 250 small-molecule library by quantitative Western blot in CFBE cells and F508del-NBD1 folding by differential scanning fluorimetry [4]. Among the 4 primary lead "hit" corrector compounds is TS-01-02-A3.

Poster Session Abstracts

Here we performed ion transport studies on native colonic biopsies collected from CF patients and mounted on Ussing chambers. Our aim is two-fold: to quantify CFTR-mediated Cl^- secretion in rectal biopsies from CF patients with different CFTR genotypes for clinical diagnosis and prognosis; and to assess the efficacy of the above correctors directly in human native tissues *ex vivo*.

CFTR cAMP-mediated Cl^- secretion was measured in freshly excised rectal biopsies from 68 individuals, as previously [5-6], allowing their classification into 3 groups. In the non-CF individuals group ($n=31$), we observed cAMP-dependent Cl^- secretion ($\Delta\text{Isc} = -92.7 \pm 26.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) upon stimulation with IBMX/Forskolin (I/F) and co-cholinergic activation with carbachol (CCH). In contrast, in one group (I) of CF patients ($n=29$), the cAMP-induced Cl^- secretion was absent and lumen-positive responses ($\Delta\text{Isc} = 32.3 \pm 5.3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$), reflecting K^+ secretion, were detected. In another group (II) of CF patients with milder clinical phenotypes ($n=8$), residual Cl^- secretory responses were detected upon I/F/CCH stimulation ($\Delta\text{Isc} = 19.1 \pm 4.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

The same biopsies used to confirm/exclude a CF diagnosis, were used to test the effects of 6.7 μM VRT-325, 10 μM C4 and 10 μM TS-01-02-A3 after 8 h incubation. Preliminary results in biopsies from F508del/F508del patients did not evidence a clear effect for VRT-325 and C4 correctors, but showed a modest effect for TS-01-02-A3. Ongoing work involves testing of efficacy of the above primary lead correctors on native tissues with longer incubation times (up to 16 h) in parallel with primary cultures of human airway cells.

These results help to further establish rectal biopsy measurements (namely CFTR-mediated Cl^- secretion) as a sensitive method for the diagnosis and prognosis of CF disease. Moreover, this approach can also identify CF patients with residual CFTR activity who can thus benefit from potentiators therapy.

Work supported by TargetScreen2 (EU-FP6-LSH-2005-037365), PIC/IC/83103/2007 grants, BioFig(FCT, Portugal, FAEPEX & FAPESP funding (Unicamp, Brazil). MS is recipient of SFRH/BD/35936/2007 PhD fellowship (FCT, Portugal). Authors are grateful to CFFT for making small molecules available.

1. Pedemonte N et al (2005) JCI 115:2564-2571.
2. Van Goor F et al (2009) PNAS 106:18825-30.
3. Van Goor F et al (2006) AJPLCMP 290:L1117-30.
4. Palma M et al (2010) ECFS-BSC, Carcavelos (Portugal), Abs 43.
5. Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.
6. Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

231★

COMPARISON OF NPD PARAMETERS IN A PHASE IIA STUDY TO OPTIMIZE DETECTION OF CFTR MODULATOR BIOACTIVITY IN CLINICAL TRIALS

Clancy, J.P.¹; Rowe, S.M.¹; Durie, P.R.²; Konstan, M.W.¹; Dunitz, J.¹; Hornick, D.B.¹; Sagel, S.D.¹; Boyle, M.P.¹; Uluer, A.Z.¹; Moss, R.B.¹; Freedman, S.³; Dong, Q.⁴; Zha, J.⁴; Stone, A.⁴; Olson, E.⁴; Ordóñez, C.⁴; Campbell, P.⁵; Ashlock, M.⁵; Accurso, F.J.¹ 1. Cystic Fibrosis Foundation, Therapeutic Development Network, MD, USA; 2. Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada; 3. Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, USA; 4. Vertex Pharmaceuticals Incorporated, Cambridge, MA, USA; 5. Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics, Inc., Bethesda, MD, USA

The recent phase IIA study of VX-770, a CFTR potentiator, in subjects with G551D-CFTR cystic fibrosis demonstrated improvements in NPD, sweat Cl^- , and lung function during drug treatment compared with placebo. This dataset afforded the opportunity to re-analyze specific NPD parameters in order to identify the optimal outcome measurements for future clinical trials. NPD measurements performed included a parameter of Cl^- ion transport, the zero Cl^- plus isoproterenol response; as well as parameters of Na^+ ion conductance, such as basal PD (average of five PD measurements within the inferior meatus), maximal (most-polarizing) basal PD, and Ringer's PD (obtained following 1 minute of Ringer's perfusion). Pre-specified NPD analyses were based on changes from baseline using mean values from both nostrils (per subject). Data were reanalyzed post-hoc to evaluate outcomes on the basis of the best nostril response per visit (defined as the most polarized NPD value for each individual measure), or the best nostril response identified pre-treatment (at baseline) carried forward throughout the trial.

Analyses were performed on pooled data from Parts 1 and 2 of the trial, at baseline (pre-treatment) and study Day 14. The detection of VX-770 effects on Cl^- conductance was generally similar across all analyses. The best nostril response identified pre-treatment analysis demonstrated significant within-subject and vs placebo changes in Cl^- transport in the 75, 150, and 250-mg groups ($P<0.05$), whereas changes from baseline using the best nostril response per visit and the mean of nostril response analyses were significant within-group only ($P<0.05$ for the 75, 150, and 250-mg groups). In general, the predicted pharmacologic effect of VX-770 on Na^+ conductance was most evident when data were analyzed using the best nostril response per visit, then the best nostril response identified pre-treatment, followed by the mean nostril response. Dose-dependent improvements in maximal basal PD were observed only in the best nostril response per visit analysis ($P<0.05$ within group and vs placebo for the 75, 150, and 250-mg groups). Based on these preliminary analyses examining the best nostril response per visit, treatment arms of <20 subjects should have 85% power to detect within-group changes in zero Cl^- plus isoproterenol -4 mV ($\text{SD}=4.0$), 90% power to detect 10 mV changes in mean basal PD ($\text{SD}=9.0$), and 90% power to detect 15 mV changes in maximal basal PD and Ringer's PD ($\text{SD}=13$). This analysis may provide more power than traditional NPD analyses based on mean values per subject, in which 24 subjects would be required for detection of -4 mV improvement ($\text{SD}=4.5$). These results may help clarify what aspects of the NPD measurement are best matched to particular analytic approaches.

This study was sponsored by Vertex Pharmaceuticals Inc. with support from CFFT.

232★

EFFECTS OF INHALED MP-376 (AEROQUIN, LEVOFLOXACIN INHALATION SOLUTION) ON THE NEED FOR OTHER ANTI-PSEUDOMONAL ANTIMICROBIALS IN STABLE CF PATIENTS WITH CHRONIC PSEUDOMONAS AERUGINOSA LUNG INFECTION

Geller, D.¹; Flume, P.A.²; Sindel, L.³; Staab, D.⁴; Fischer, R.⁵; Loutit, J.⁶; Conrad, D.⁷ 1. Nemours Children's Clinic, Orlando, FL, USA; 2. Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA; 3. Pulmonary Associates of Mobile, Mobile, AL, USA; 4. Charité-University Hospital Berlin, Berlin, Germany; 5. Med. Klinik Innenstadt, Munich, Germany; 6. Mpx Pharmaceuticals, San Diego, CA, USA; 7. University California San Diego, San Diego, CA, USA

Introduction: New treatment options for inhaled antimicrobials are needed for CF patients to reduce the morbidity caused by chronic airway infections. This study assessed the efficacy and safety of MP-376 (Aeroquin), a novel levofloxacin formulation for inhalation, in CF patients with extensive previous use of inhaled antimicrobials for chronic PA lung infection.

Methods: Randomized, double-blind, placebo controlled trial of 3 dose groups of MP-376 (120 mg QD, 240 mg QD, 240 mg BID) vs. placebo for 28 days, delivered by a customized investigational PARI eFlow nebulizer, with an additional 28 days of follow up. Inclusion criteria: age ≥ 16 years, chronic PA airways infection, FEV1 between 25-85% predicted, and ≥ 3 courses of inhaled antibiotics over the past 12 months. The protocol-defined endpoint of needing an anti-pseudomonal antimicrobial was satisfied if a patient had at least one of 4 symptoms commonly seen with exacerbations at the time of initiation of anti-pseudomonal antimicrobials. Results are presented for the MITT patient population.

Results: One hundred fifty-one patients were enrolled with mean baseline characteristics including age 29 years, FEV1 52% of predicted, and 4.8 courses of inhaled antibiotics over the prior 12 months. Concomitant respiratory medications included dornase-alfa (78%), azithromycin (74%), and hypertonic saline (46%).

MP-376 treatment was associated with a reduction in the need for additional anti-pseudomonal antimicrobials during the treatment and follow up periods compared to placebo. Hazard ratios estimated using Cox proportional modeling showed a statistically significant reduction in the need for anti-pseudomonal antimicrobials in all 3 MP-376 groups vs. placebo (120 mg QD HR 0.29, $P=0.007$; 240 mg QD HR 0.39; $p=0.021$; 240 mg BID HR 0.21; $p=0.0007$), with the greatest effect seen in the 240 mg BID group.

RE: ASSESSMENT OF CFTR CL⁻ SECRETION IN HUMAN COLON AND EFFICACY OF F508DEL-CFTR CORRECTORS IN HUMAN NATIVE TISSUES

Dear Ms:

We are pleased to inform you that the above-referenced abstract has been accepted for poster presentation during the 2010 North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) to be held October 21-23, 2010 at the Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland. Pre-conference sessions, including Special Classes and Short Courses, are scheduled on Wednesday, October 20. Your abstract will be included in the conference proceedings to be published as a supplement to *Pediatric Pulmonology*.

In addition to presentation as a poster, your abstract has been selected for oral presentation in the following workshop:

W12. CF Endpoints Revisited: How Best to Interpret Clinical Interventions

In general, oral presentations in workshops will be scheduled for 10 minutes, followed by 5 minutes of discussion. The time your presentation is scheduled appears in the Preliminary Program and the moderators of the workshop will be in touch with you before the conference to discuss your role. Visual aids to accompany presentations must be prepared in PowerPoint. You will be required to submit your presentation in advance of the conference and to check in at the Speaker Ready Room before your presentation. Further details concerning your role and responsibilities as a workshop speaker, including information about preparation and submission of your presentation, will be sent to you shortly.

All posters will be displayed in Exhibit Halls E-F at the Baltimore Convention Center. The space available for your poster is 4 feet wide by 4 feet high. It **MUST** be constructed to fit **WITHIN** that space. You are encouraged to make your presentation as clear and concise as possible. Your poster may contain text, tables, photographs, etc., and should contain the most recent data available at the time of the meeting, even though it may not have been included in your abstract.

On behalf of the NACFC Program Planning Committee and the CF Foundation, we thank you for sharing your exciting work with the CF community! We sincerely appreciate your interest in the meeting and look forward to your participation.

Sincerely,
Christopher M. Penland, Ph.D.
Director of Research
Cynthia L. Adams
Director of Medical Meetings

Assessment of CFTR-mediated Cl⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies as Predictive Tool for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis

^{1,2}Marisa Sousa, ³Maria F Servidoni, ³Luciana C Bonadia, ³Adriana M Vinagre, ^{1,2}Anabela S Ramalho, ²Verónica Felício, ³Maria A Ribeiro, ^{1,2}Inna Uliyakina, ^{3,4}Arthur Kmit, ³Silvia R Cardoso, ³José D Ribeiro, ³Carmen Bertuzzo, ³Antônio F Ribeiro, ⁴Karl Kunzelmann, ^{1,2}Margarida D Amaral

¹DG-INSA, Lisboa, Portugal, ²BioFIG-FCUL, Lisboa, Portugal, ³FCM-Unicamp, Campinas, Brazil, ⁴IP-UR, Regensburg, Germany.

Cystic Fibrosis (CF), the most frequent genetic autosomic disease affecting Caucasians (1-3,000 newborns in Portugal), due to mutated gene encoding CFTR protein, a Cl⁻ channel expressed at the apical membrane of epithelia, is dominated by severe pulmonary disease leading to premature death (median age of death in Europe ~25 yrs) but prognosis, and sometimes diagnosis, is difficult.

Our aim is here was to quantify CFTR-mediated Cl⁻ secretion by Ussing-chamber measurements^[1-3] in rectal biopsies from CF-patients with different CFTR genotypes and correlate them with clinical data, to assess the potential of this parameter for clinical diagnosis and prognosis. Such measurements have advantages vs respiratory epithelium, as rectal tissue is easier to obtain (painless procedure) and less deteriorated by secondary events.

We performed ion transport studies in rectal biopsies from 114 individuals, as previously described^[2-4] and classified them into three groups: 1) group I (n=34), where a large cAMP-dependent Cl⁻ secretion ($\Delta I_{sc} = -134.23 \pm 19.98 \mu A/cm^2$) was observed upon stimulation with IBMX/Fsk/CCH indistinguishably from the controls; 2) group II (n=46) where the cAMP-induced Cl⁻ secretion was absent and lumen-positive responses were detected ($\Delta I_{sc} = +30.06 \pm 2.72 \mu A/cm^2$), reflecting K⁺ secretion; 3) group III (n=12) evidencing residual Cl⁻ secretory responses upon IBMX/Fsk/CCH stimulation ($\Delta I_{sc} = -21.98 \pm 6.54 \mu A/cm^2$). These results led us to discard CF for group I individuals and confirm CF for groups II and III.

From their CFTR-genotypes, we concluded that severe CF-mutations were associated with absence of Cl⁻ secretion, whereas mild mutations were related to residual cAMP-mediated Cl⁻ secretion, as before^[3]. Thus, CFTR function facilitates the correlation between CF genotype-clinical phenotype and the understanding of CF-pathophysiology. Altogether, the results indicate that this technique is a sensitive method for the diagnosis and prognosis of CF which can also be used *ex vivo* to test therapeutic compounds^[4].

Work supported by TargetScreen2 (EU-FP6-LSH-2005-037365), PIC/IC/83103/2007 grants, BioFIG (PEst-OE/BIA/UI4046/2011) (FCT, Portugal) and FAPESP funding (Unicamp, Brazil). MS and IU are recipients of SFRH/BD/35936/2007 and SFRH/BD/69180/2010 PhD fellowship (FCT, Portugal), respectively.

[1] Veeze HJ et al (1991) Gastroenterology 101:398-403.

[2] Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

[3] Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.

[4] Roth EK et al (2011) PLoS ONE 6(8): e24445.

Assessment of CFTR Cl⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies as Predictive Tool for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis



Marisa Sousa^{1,2}, Maria F Servidoni³, Luciana Bonadia³, Adriana M Vinagre³, Anabela S Ramalho^{1,2}, Verónica Felício^{1,2}, Maria A Ribeiro³, Inna Uliyakina^{1,2}, Arthur Kmitš³, Silvia R Cardoso³, José D Ribeiro³, Carmen Bertuzzo³, Antônio F Ribeiro³, Karl Kunzelmann⁴ and Margarida D Amaral^{1,2}

¹ Department of Genetics - National Institute of Health, Lisboa, Portugal; ² University of Lisboa - Faculty of Sciences, BioFIG Centre, Portugal; ³ University of Campinas - Faculty of Medical Sciences, SP, Brazil; ⁴ Department of Physiology, University of Regensburg, Germany

Background

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent genetic autosomal disease affecting Caucasians (1-3,000 newborns in Portugal). It is caused by mutations in CFTR gene which encodes for CFTR protein, a Cl⁻ channel expressed at the apical membrane of epithelia. The lack of function of the CFTR channel leads to a severe phenotype, dominated by severe pulmonary disease leading to premature death (median age of death in Europe ~25 yrs) but prognosis, and sometimes diagnosis, is difficult. Several studies have investigated the potential abnormalities in electrogenic Cl⁻ secretion in the intestinal epithelium of CF patients by using chamber measurements using cell cultures, jejunal or rectal tissue biopsies [1-4]. Such measurements have advantages vs respiratory epithelium, as rectal tissue is easier to obtain (painless procedure) and less deteriorated by secondary events. Here, we performed ion transport studies in 492 native colonic biopsies from 125 Brazilian individuals. From the recordings already analyzed (114/125 subjects), 86.6% of biopsies provided quantifiable and interpretable data (395/456 biopsies).

Goals

- To assess CFTR-mediated Cl⁻ secretion in rectal biopsies from individuals:
 - with different CFTR-genotypes;
 - with clinical suspicion of CF for confirmation/exclusion of a CF diagnosis.
- To correlate CFTR function with genotypes and clinical data (phenotypes), as to assess the potential of this parameter for clinical diagnosis and prognosis.

Standardized Protocol to Assess CFTR Function in Human Rectal Biopsies

Compound (concentration, compartment)	Effects and characteristic responses in normal vs. CF tissues
I Amiloride¹ (20 μM, lu)	Inhibition of electrogenic Na ⁺ absorption by the amiloride-sensitive epithelial Na ⁺ channel (ENaC). Amiloride-sensitive Na ⁺ transport is increased in CF rectal biopsies.
II CCH² (100 μM, bl)	Activation of cholinergic (Ca ²⁺ - activated) secretion under basal conditions. CCH typically induces Cl ⁻ secretory responses (lumen-negative) in normal tissues, and inverse K ⁺ secretory responses (lumen-positive) in CF tissues. However, likely due to low endogenous prostaglandins (PG) levels, lumen-positive responses are observed in ~20-30% of normal tissues.
III Indomethacin¹ (10 μM, bl)	Inhibition of basal cAMP-dependent Cl ⁻ secretion by inhibition of PG formation in native tissues. In normal tissues, basal Cl ⁻ secretion is largely inhibited by indomethacin treatment (45-60 min). CF tissues lack basal Cl ⁻ secretion.
IV CCH² (100 μM, bl)	Activation of cholinergic (Ca ²⁺ - activated) secretion in the presence of indomethacin. After indomethacin pre-treatment (i.e., CFTR inhibition), CCH induces K ⁺ secretion (lumen-positive) in normal and CF tissues. Due to the overlap of bioelectric responses in normal and CF, assessment of cholinergic responses is not reliable to discriminate between normal and CF under these experimental conditions.
V IBMX/Forskolin¹ (100/2 μM, bl)	Activation of cAMP-dependent (CFTR-mediated) secretion. cAMP-dependent activation induces sustained Cl ⁻ secretory responses in normal, but not in CF tissues.
VI CCH² (100 μM, lu)	Activation of cholinergic (Ca ²⁺ - activated) secretion in the presence of IBMX/Forskolin. Cholinergic co-activation further increases Cl ⁻ secretion in normal tissues, and induces an inverse K ⁺ secretory response in CF tissues.

Table 1 - Sequence of application of pharmacological compounds in using chamber V_{oc} measurements (I-VI): ¹Amiloride, indomethacin and IBMX/forskolin are added as indicated, and continuously present in the bath solution thereafter. ²CCH is added under basal conditions (I), and after pretreatment with indomethacin (IV) and IBMX/forskolin (V). **The CCH induced responses (peak and plateau responses) are recorded under these different experimental conditions (i.e., absence and presence of cAMP-dependent stimulation).** Each application of CCH is followed by a 10-15 min washout period. **HCO₃⁻ free buffer solutions were used to exclude a possible contribution of CFTR-independent electrogenic HCO₃⁻ secretion, which would be indistinguishable from electrogenic Cl⁻ secretion and thus may mimic residual Cl⁻ channel function in CF tissues [4].** Abbreviations: lu = luminal, bl = basolateral application. Table adapted from reference [3].

Using Chamber Transepithelial Voltage Measurements for a CF Diagnosis

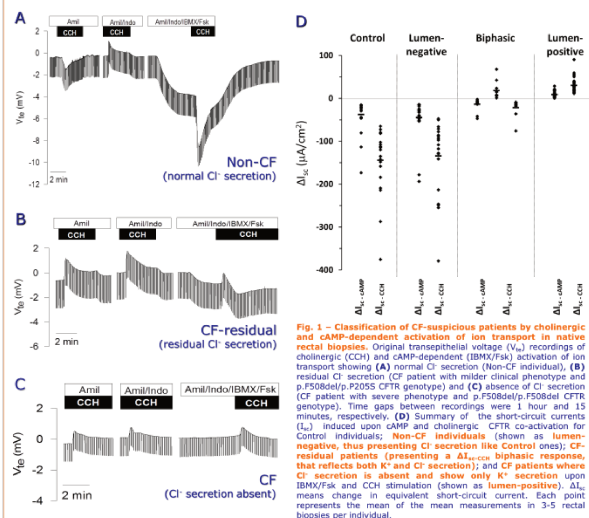


Fig. 1 - Classification of CF-suspect patients by cholinergic and cAMP-dependent activation of ion transport in native rectal biopsies. Original transepithelial voltage (V_{oc}) recordings of cholinergic (CCH) and cAMP-dependent (IBMX/Forsk) activation of ion transport showing (A) normal Cl⁻ secretion (Non-CF individual), (B) residual Cl⁻ secretion (CF patient with milder clinical phenotype and p.F508del/p.P205S CFTR genotype) and (C) absence of Cl⁻ secretion (CF patient with severe phenotype and p.F508del/p.F508del CFTR genotype). Time gaps between recordings were 1 hour and 15 minutes, respectively. (D) Summary of the short-circuit currents (I_{sc}) induced upon CCH and cholinergic CFTR co-activation for Control individuals; Non-CF individuals (shown as lumen-negative, thus presenting Cl⁻ secretion like Control ones); CF-residual patients (presenting a ΔI_{sc-CCH} biphasic response, that reflects both K⁺ and Cl⁻ secretion); and CF patients where Cl⁻ secretion is absent and show only K⁺ secretion upon IBMX/Forsk and CCH stimulation (shown as lumen-positive). ΔI_{sc} means change in equivalent short-circuit current. Each point represents the mean of the mean measurements in 3-5 rectal biopsies per individual.

References

- Wente TR et al (1994) JCF 3:461-466.
- Wente TR et al (2004) Gastroenterology 127:1083-95.
- Wente TR et al (2004) JCF 3:185-189.
- Hall M et al (2004) Gastroenterology 126:32-41.
- Shwachman H, Kulczycki L, Allen AJ, Liu CH (1966-1975).
- Rosenbaum SJ & Cutting GR (1998) Pediatrics 102:589-595.

Acknowledgements

We thank all the patients who participated in this study. We also thank the staff of the CFTR laboratory for their technical assistance and the staff of the CFTR laboratory for their technical assistance.

CFTR Genotypes and CFTR Function in Rectal Epithelia

Individuals Classification by CFTR function	6 mutations screening*	Established Genotypes
Group I Non-CF individuals (normal Cl ⁻ secretion, n = 34)	NI / NI ¹ (11) p.F508del neg n.d. ² (12) (10)	p.F508del Carrier (1) p.F508del / p.F508del (27) p.F508del / p.G542X (6) p.F508del / p.R1162X (1) p.R1162X / p.R1162X (2) p.F508del / p.1717-1G>A (1) p.F508del / p.2183AA>G (1) p.G542X / p.2183AA>G (1)
Group II CF patients (Cl ⁻ secretion absent, n = 46)	p.F508del / NI ¹ (1) p.3120+1G>A / NI ¹ (2) p.W1282X / NI ¹ (1)	p.F508del / p.1812-1G>A (2) p.F508del / p.N1303K (1) p.F508del / p.R334A (2) p.F508del / p.S549R (1) p.F508del / p.G85E (1) p.F508del / p.3272-26A>G (1) p.F508del / p.P205S (1) p.G542X / p.P205S (1) p.3120+1G>A / NI ¹ (1) p.G542X / p.1618T (1) p.F508del / c.1584+18672bp A>G (2)
Group III CF-residual patients (residual Cl ⁻ secretion, n = 12)	p.3120+1G>A / NI ¹ (1)	p.G542X / p.1618T (1) p.F508del / c.1584+18672bp A>G (2)

Table 2 - Relationship between CFTR genotypes and CFTR function in human rectal biopsies. CFTR function was determined in colonic epithelia from the CFTR Cl⁻ secretory responses induced by cAMP and cholinergic agonists. **Severe mutations were associated with absence of Cl⁻ secretion, whereas mild mutations were related to residual cAMP-mediated Cl⁻ secretion.** *DNA from patients was firstly screened for a panel of the 6 most common mutations in the district of Campinas (SP, Brazil) (p.F508del, p.G551S, p.G542X, p.R1162X, p.N1303K, p.R553X). ¹NI means that none of these 6 mutations was identified in the screening. ²n.d. means screening was not done yet.

CF Clinical Phenotypes and Colonic CFTR Cl⁻ secretion

	CF (Cl ⁻ secretion absent)	CF (residual Cl ⁻ secretion)
$I_{sc-CAMP}$ [$\mu A/cm^2$] [% of control] (n)	+8.55 ± 1.24 [0 %] (46)	-13.87 ± 4.97 [31.37 %] (12)
I_{sc-CCH} [$\mu A/cm^2$] [% of control] (n)	+30.06 ± 2.72 [0 %] (46)	-21.98 ± 6.54 [20.60 %] (12)
Age at study (years) (n)	11.06 ± 7.94 (46)	23.31 ± 15.85 (12)
Shwachman-Kulczycki Score (n)	68 ± 14.91 (46)	75 ± 15.16 (6)
Sweat Cl ⁻ (mmol/L) (n)	109.48 ± 20.63 (43)	91.86 ± 26.17 (6)
Body Mass Index (BMI) (n)	17.14 ± 3.27 (42)	19.80 ± 3.41 (9)
Pancreatic Insufficiency (PI) (n)	100% (46)	33.3% (12)
Pulmonary Function (n)	35	8
Age (years)	13.57 ± 7.11	22.25 ± 8.91
FVC % predicted	80.14 ± 20.40	71.37 ± 18.31
FEV ₁ % predicted	71.74 ± 20.19	64.50 ± 31.49

expressing residual CFTR-mediated Cl⁻ secretion (CF-residual). CFTR Cl⁻ channel function was determined in native rectal epithelia from CF secretory responses induced by IBMX/forskolin (L_{sc-CAMP}) and after cholinergic activation with carbachol (L_{sc-CCH}). Pancreatic Insufficiency (PI) was defined by a history of malabsorption and fecal elastase E1 levels of <200 μg/g stool. The most recent measurements of forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) were evaluated only for patients > 6 years and expressed as a percentage of predicted normal values for sex, age and height. Shwachman-Kulczycki clinical scores were determined as described before [5]. Data are shown as mean ± STD (or SEM for L_{sc}). NI means the total of patients evaluated in each item.

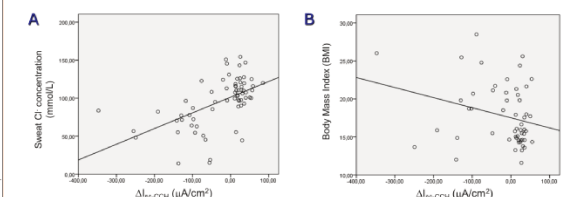


Fig. 2 - Relationship between CFTR function and Sweat Chloride Concentration or Body Mass Index values. CFTR Cl⁻ channel function was determined in native rectal epithelia from Cl⁻ secretory responses induced by IBMX/Forsk/Carbachol (L_{sc-CCH}). Lumen-negative ΔI_{sc} responses reflect Cl⁻ secretion, lumen-positive ΔI_{sc} responses reflect K⁺ secretion. Correlation between CCH-induced I_{sc} and (A) sweat Cl⁻ concentration (p = 0.000), and (B) body mass index (p = 0.049). Regression Analysis Model (p values obtained from ANOVA test).

Summary

- CFTR cAMP-mediated Cl⁻ secretion was measured in 492 freshly excised rectal biopsies from 125 individuals and allowed their classification into 3 groups:
 - Group (I) Non-CF individuals (n=34): a large cAMP-dependent Cl⁻ secretion ($\Delta I_{sc} = -134.23 \pm 19.90 \mu A/cm^2$), similar to that of Control individuals (n=22; $\Delta I_{sc} = -144.17 \pm 19.01 \mu A/cm^2$), was observed upon stimulation with IBMX/Fsk and co-colinergic activation with CCH.
 - Group (II) CF patients (n=46): the cAMP-induced Cl⁻ secretion was absent and lumen-positive responses ($\Delta I_{sc} = +30.06 \pm 2.72 \mu A/cm^2$), reflecting K⁺ secretion, were detected.
 - Group (III) CF-residual patients (n=12): residual Cl⁻ secretory responses were detected upon IBMX/Fsk/CCH stimulation ($\Delta I_{sc} = -21.98 \pm 6.54 \mu A/cm^2$).
- The correlation between CF genotype-phenotype and CFTR function facilitates the understanding of CF pathophysiology.
- These results help to further establish rectal biopsy measurements (namely CFTR-mediated Cl⁻ secretion) as a sensitive method for the diagnosis and prognosis of CF disease. Moreover, this approach can also identify CF patients with residual CFTR activity who can thus benefit from potentiators therapy.

Materials & Methods

This study was approved by the Ethical Committee at the University Hospital of Unicamp (University of Campinas, SP, Brazil) and all patients gave their written informed consent. For children < 18 years of age, parents obtained detailed information and gave their signed informed consent. The clinical diagnosis of CF was established based on consensus clinical criteria (e.g. increased sweat Cl⁻ concentrations ($\geq 60 mmol/L$) and/or detection of two CFTR mutations [6]).

CFTR Genotyping

Screening for the 6 most common CFTR mutations (Table 2 - legend) in the district of Campinas (SP) was performed by allele-specific polymerase chain reaction (PCR) and detecting gel electrophoresis. To detect CFTR mutations that were not identified by the above described screening method, we performed automatic DNA sequencing of all 27 exons and the respective flanking intronic regions of the CFTR gene.

Using chamber experiments

Superficial rectal mucosa specimens (3-4 mm in diameter) were collected by Endoflex forceps (3.4mm) and immediately stored in ice-cold RPMI1640 + 5% PBS. Rectal biopsy specimens were mounted in modified mucosa chambers as previously described [3, 4]. In brief, the luminal and basolateral surfaces of the epithelium were perfused continuously (5 mL/min) with a bicarbonate buffer solution (HCO₃⁻ free) containing (mmol/L): NaCl 135, KCl 4.0, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.0, D-glucose 5.0, HEPES 10.0, Ca-phosphate 1.0, pH 7.40. Experiments were performed under open-circuit conditions. Values for the transepithelial voltage (V_{oc}) were referenced to the luminal surface of the apical membrane. Transmembrane resistance (R_{tm}) was determined by passing a 10 nA current pulse (0.5 μs). The equivalent short-circuit current (I_{sc}) was calculated according to Ohm's law from V_{oc} and R_{tm} ($I_{sc} = V_{oc} / R_{tm}$) after appropriate correction for fluid resistance.

From: 20-10-2011

5.3.1 Sociedade Portuguesa de Genética Humana SPGH *spgh2011@gmail.com*

Caro colega,

Temos todo o gosto em informá-lo de que o resumo que submeteu para a reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética Humana foi aceite para Comunicação Oral. Na tabela anexa encontra a lista de Comunicações Orais, assim como a sessão, dia e hora em que deve apresentar o seu trabalho. Cada apresentação não deverá exceder os 10 minutos, com 5 minutos adicionais para discussão.

Relembramos que o primeiro autor de cada trabalho deve apresentá-lo e, para tal, deve inscrever-se na reunião. O prazo de inscrição a custo reduzido terminará na próxima segunda-feira, dia 24 de Outubro.

Com os melhores cumprimentos,

*Astrid Moura Vicente
Presidente, SPGH 2011*

*Luisa Romão
Secretária, SPGH 2011*

Rectal Forceps Biopsy Procedure in Cystic Fibrosis: Technical Aspects and Patients Perspective for Clinical Trials Feasibility

Maria F Servidoni¹, Marisa Sousa^{2,3}, Adriana M Vinagre¹, Silvia R Cardoso¹, Maria A Ribeiro¹, Luciana R Meirelles¹, Rita B de Carvalho¹, Karl Kunzelmann⁴, Antônio F Ribeiro¹, José D Ribeiro¹, Margarida D Amaral^{2,3}

¹Gastrocenter and Department of Pediatrics and Genetics, Faculty of Medical Sciences- State University of Campinas (Unicamp), Brazil. ²BioFIG; Faculty of Sciences, University of Lisboa and ³National Institute of Health, Lisboa, Portugal. ⁴Institut für Physiologie - Universität Regensburg, Regensburg, Germany

Measurements of CFTR function in rectal biopsies *ex vivo* have been used for the diagnosis and prognosis of Cystic Fibrosis (CF) disease. Here, we aimed to evaluate this procedure regarding: 1) viability of the rectal specimens obtained by biopsy forceps for *ex vivo* bioelectrical/biochemical analyses; 2) overall assessment (comfort, invasiveness, pain, sedation requirement) of the rectal forceps biopsy from the patients perspective to assess its feasibility as an outcome measure in clinical trials. **Methods:** We compared three bowel preparation solutions (NaCl 0.9%, glycerol 12%, mannitol), and two biopsy forceps (standard and jumbo) in 580 rectal specimens from 132 individuals (CF and non-CF). 75 CF individuals who underwent the sigmoidoscopy were assessed by telephone surveys. **Results:** Integrity and friability of the tissue specimens correlate with their transepithelial resistance ($r=-0.438$ and -0.305 , respectively), both are influenced by the bowel preparation solution and biopsy forceps used, being NaCl and jumbo forceps the most compatible methods with the electrophysiological analysis. The great majority of the individuals (76%) did not report major discomfort due to the short procedure time (max 15min) and considered it relatively painless (79%). Importantly, most (88%) accept repeating it at least for one more time. **Conclusions:** Obtaining rectal biopsies with a flexible endoscope and jumbo forceps after bowel preparation with NaCl solution is a safe procedure for both children and adults and yields viable specimens for CFTR bioelectrical/biochemical analyses. The procedure is well tolerated by patients, demonstrating its feasibility as an outcome measure in clinical trials.

Work supported by FCT-PTDC/SAU-GMG/122299/2010 grant to MDA and (PEst-OE/BIA/UI4046/2011) BioFIG centre grant (POCTI/FCT/PIDDAC, Portugal) and FAPESP (SPFR, Brazil). MS was recipient of SFRH/BD/35936/2007 PhD fellowship (FCT, Portugal)



Rectal Forceps Biopsy Procedure in Cystic Fibrosis: Technical Aspects and Patients Perspective for Clinical Trials Feasibility

Maria F Servidoni¹, Marisa Sousa², Adriana M Vinagre¹, Silvia R Cardoso¹, Maria A Ribeiro¹, Luciana R Meirelles¹, Rita B de Carvalho¹, Karl Kunzelmann³, Antônio F Ribeiro¹, José D Ribeiro¹, Margarida D Amaral²

¹ Gastrocenter and Department of Pediatrics and Genetics, Faculty of Medical Sciences- State University of Campinas (Unicamp), Brazil.

² BioFIG: Faculty of Sciences, University of Lisboa, Portugal and ³ Institut für Physiologie – University of Regensburg, Regensburg, Germany



BACKGROUND

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent genetic autosomal disease affecting Caucasians (1-3,000 newborns in Portugal). It is caused by mutations in CFTR gene which encodes for CFTR protein, a Cl⁻ channel expressed at the apical membrane of epithelia. The lack of function of the CFTR channel leads to a severe phenotype, dominated by severe pulmonary disease leading to premature death (median age of death in Europe ~25 yrs) but prognosis, and sometimes diagnosis, is difficult. Measurements of CFTR function in rectal biopsies *ex vivo* have been used for diagnosis and prognosis of CF disease [1-5]. Such measurements have advantages vs respiratory epithelium, as rectal tissue is easier to obtain (painless procedure) and less deteriorated by secondary events.

OBJECTIVES

We aimed to evaluate this procedure regarding:

- viability of the rectal specimens obtained by biopsy forceps for *ex vivo* bioelectrical and biochemical laboratory analyses;
- overall assessment (comfort, invasiveness, pain, sedation requirement, etc) of the rectal forceps biopsy procedure from the patients perspective to assess its feasibility as an outcome measure in clinical trials.

METHODS

We compared three bowel preparation solutions (NaCl 0.9%, glycerol 12%, mannitol), and two biopsy forceps (standard and jumbo) in 580 rectal specimens from 132 individuals (CF and non-CF) (Figure 1). Assessment of the overall rectal biopsy procedure obtained by biopsy forceps by patients was carried out by telephone surveys to 75 individuals who underwent the sigmoidoscopy procedure (Figure 1).

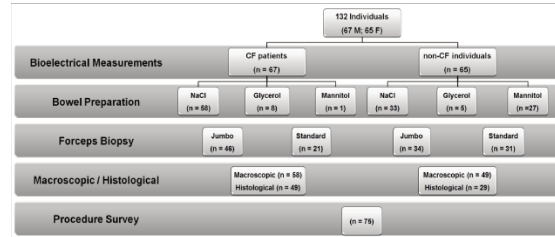


Figure 1: Flow-chart of the technical biopsing aspects assessed in the present study. Bioelectrical measurements (trans-epithelial resistance, R_{te}) were performed for rectal biopsies (n = 580) from all the individuals enrolled in the study (n = 132) to assess tissue viability [5]. Bowel preparation included enemas of either NaCl 0.9%, glycerol 12% (v/v) or oral mannitol 20% (w/v) solutions. Two different biopsy forceps were tested, namely jumbo (3.4mm Ø) and standard (2.5mm Ø). Independently of bowel preparation, Macroscopic and histologic evaluation of rectal biopsies was achieved for 107 and 78 individuals, respectively. Patient assessment surveys were carried out for 75 individuals undergoing sigmoidoscopy with rectal biopsy collection by biopsy forceps, divided into 4 age groups, namely (yrs): 0-9 (n=21), 10-19 (n=33), 20-29 (n=7), ≥30 (n=14). Most patients were children (median age=13 yrs).

RESULTS



Figure 2: Practical aspects of the procedure. (A) standard forceps (Klympuelli 2.5mm; Shirakusa, Tokyo, Japan) and jumbo forceps (Endoflex® 3.4mm; Völcke, Germany). (B) Individuals were examined in the left lateral decubitus position. The distal 10cm of the scope was lubricated with a water-soluble jelly and it was then inserted into the rectum by exerting gentle pressure by the scope tip on the anal sphincter until it relaxed. Superficial rectal biopsies were collected laterally at 15 to 25 cm from the anal verge in a low vascularized mucosa. (C) Rectal biopsies obtained with jumbo and standard forceps.

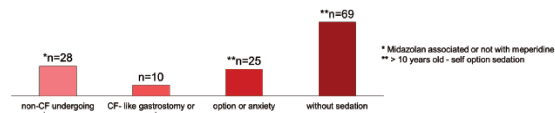


Figure 3: Sedation used among the individuals enrolled in the study. From the 132 individuals enrolled in this study, 63 performed endoscopic procedures under sedation and 69 without. Intravenous sedation with midazolam (associated or not with meperidine) was performed for all individuals undergoing colonoscopy (n=28) for other reasons than the rectal biopsy procedure (these were all non-CF individuals). Sigmoidoscopy was done with or without sedation depending if the individual was already performing other procedures (like gastroscopy or upper endoscopy, n=10) or depending on individuals' will, collaboration or anxiety (n=25, i.e., only 24% of the patients undergoing sigmoidoscopy preferred to be sedated).

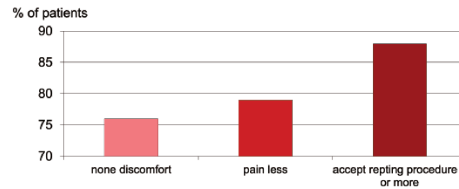


Figure 4: Patients' evaluation of the overall rectal biopsy procedure. Patients were asked to assess the rectal biopsy procedure by posing several questions targeting 3 broad categories: i) procedural pain/discomfort; ii) comparison with other clinical/diagnosis procedures; and iii) acceptance towards the possible introduction of this method as an outcome measure in clinical trials. Data show that 57/75 (76%) of the interviewed individuals did not report high levels of discomfort, independently of sedation or age. The great majority of the individuals (66/78) reported that this is a painless procedure, regardless of sedation, age or gender. Most of the individuals (66/78) accept repeating this procedure for at least one more time (15.7% for one more time; 12% for two more times; 4% for three more times; and 53.3% for four more times), while only a minority (12%, 9/75) do not wish to repeat it (data not shown), also independently of sedation, age and gender.

	Jumbo	Standard
Tissue integrity	1.07 ± 0.09	2.04 ± 0.18
Fraility	1.26 ± 0.10	1.47 ± 0.15
Bleeding	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.14
Mucus	1.02 ± 0.08	1.09 ± 0.09
R_{te} ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	20.97 ± 0.81	14.01 ± 0.86

NOTE: Results are mean ± SEM; n=107. There are significant differences in tissue integrity ($p=5.51 \times 10^{-4}$) and also between means of R_{te} ($p=8.42 \times 10^{-4}$) for biopsy forceps.

Table 1. Summary of macroscopic evaluation data and bioelectrical measurements (R_{te}) of rectal biopsies vs. biopsy forceps. Tissues were macroscopically evaluated regarding bleeding, mucus, biopsy thickness (presence of submucosa or not), and also for friability (tissue breakdown from manipulation), in a scale from 0 to 3 (from absence to clear presence of the descriptor). Regarding tissue integrity resulting from the biopsing procedure, the scale was inverted to facilitate the technicians' evaluation, i.e., 0 means full integrity of the specimen while 3 means that the tissue is fully disrupted (i.e. integrity is not present). Data was averaged for 2-3 biopsies/individual to obtain a single value per individual. Trans-epithelial resistance (R_{te}) measurements in Using chamber were obtained as described before [5]. Overall, mean values for tissue integrity (jumbo=1.07±0.09 vs standard=2.04±0.18) and also for R_{te} (jumbo=20.97±0.81 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ vs standard=14.01±0.86 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) were shown to be statistically different ($p=5.51 \times 10^{-4}$ and $p=8.42 \times 10^{-4}$, respectively, with jumbo forceps providing the best results).

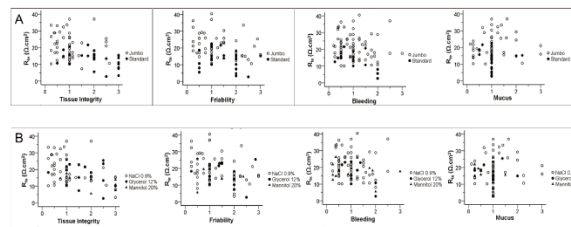


Figure 5: Correlations between tissue trans-epithelial resistance (R_{te}) and macroscopic descriptors (tissue integrity, friability, bleeding and mucus) according to (A) biopsy forceps and (B) bowel preparation (n = 107 individuals). Data for both tissue integrity and friability show good correlations ($r=0.438$, $p=8.51 \times 10^{-4}$ and $r=0.305$, $p=0.0010$, respectively) with tissue viability (assessed by R_{te} measurements) and are influenced by bowel preparation and biopsy forceps. Data concerning presence/absence of bleeding and mucus do not correlate with tissue viability (R_{te}), but interestingly there is a trend positive correlation between mucus and R_{te} ($r=0.076$), indicating that presence of mucus (i.e. probably resulting from a less "aggressive" bowel cleaning) could somehow serve to preserve tissue viability. We found no influence by usage of sedation in the procedure regarding tissue viability (data not shown).

CONCLUSIONS

- NaCl preparation and jumbo forceps the most compatible methods with the electrophysiological analysis.
- The great majority of the individuals (76%) did not report major discomfort due to the short procedure time (max 15min) and considered it relatively painless (79%).
- Importantly, most (88%) accept repeating it at least for one more time and 53% for more than 4 times.

Overall, this is a safe procedure that can be easily adopted for both adults and children (age range was 6 months to 52 years), yielding viable specimens for CFTR bioelectrical/biochemical analyses. The procedure is well tolerated by patients, demonstrating its feasibility as an outcome measure in clinical trials.

REFERENCES

- Veeze HJ et al (1994) JCF 93:461-466.
- Hirtz S et al (2004) Gastroenterology 127:1085-95.
- Sousa et al (2012) PLoS one 7(10):e47708.
- Mall M et al (2004) JCF 3:165-169.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work supported by FCT-PTDC/SAU-GMG/122209/2010 grant to MDA and (PEst-OE/BIA/UID049/2011) BioFIG centre grant (POCT/FCT/PTDC/SAU-GMG/122209/2010 grant to MDA and (PEst-OE/BIA/UID049/2011) BioFIG centre grant (POCT/FCT/PTDC/SAU-GMG/122209/2010 grant to MDA and (PEst-OE/BIA/UID049/2011) BioFIG centre grant).

Portugal). Authors are grateful to CF patients and volunteers for their participation in this study.

mfservidoni@hotmail.com

Poster Confirmation

Dear Maria Servidoni,

Re Your Abstract: "Rectal Forceps Biopsy Procedure in Cystic Fibrosis: Technical Aspects and Patients Perspective for Clinical Trials Feasibility"

On behalf of the European Cystic Fibrosis Society, we would like to thank you for submitting the above abstract A-516-0004-00291 to the 36th European Cystic Fibrosis Conference to be held at the Congress Centre Lisboa in Lisbon, 12 - 15 June 2013. After careful review by several experts in the field, your submission has been accepted as **Poster**.

For any further correspondence, please note that your abstract is now registered under the new abstract number **49**. This will also be your poster number.

The poster areas will be situated on Level 0 of the conference venue.

The size of your poster should not exceed 90 cm in width and 120 cm in height (vertical format). Fixing materials will be available in the Poster areas.

Poster mounting on specified poster boards will commence on Wednesday, June 12, 2013 at 14:00 with removal of poster to be completed by Saturday June 15, 2013 between 12:30 and 14:00. Posters not removed at the time will be discarded. Posters and other material will not be sent to you after the conference.

A timetable when authors should be at their posters for presentation will be published on the conference website and also in the conference programme. In case of time conflict due to other commitments, authors are requested to indicate on the poster slot when they will be available for presentation. Authors who agree to have their contact details made available to delegates are asked to include the information (e.g. e-mail address) on their posters.

You are requested to prepare an electronic poster (ePoster) as well.

ePosters are short PowerPoint presentations that summarize your work following the same principles as a paper poster. **Your ePoster is to be uploaded via the internet on a central server before the start of the conference.** The website to upload your poster will open by the end of March and you will be contacted by e-mail with login details and specific instructions. Your ePoster will be available for viewing on dedicated computers for the whole duration of the conference (Exhibition and Poster Areas - level 0). During this time, conference attendees will be able to post comments or questions on your work. After the conference, your ePoster will be available for viewing on the ECFS website.

PLEASE DO NOT FORGET that the reduced registration fee is available until **March 21**.

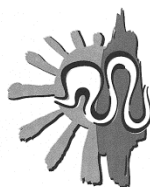
To assist in the overall planning for the conference, we would be grateful if you could send an e-mail to ecfs2013-abstracts@kit-group.org confirming the name of the abstract presenter as Maria Servidoni until **April 5th**.

We look forward to welcoming you in Lisbon.

With best regards,

Your ECFS 2013 Secretariat
36th European Cystic Fibrosis Conference

P-021



15º CONGRESSO BRASILEIRO DE
Gastroenterologia
Pediátrica

19º CONGRESSO LATINO AMERICANO E
10º CONGRESSO IBERO AMERICANO DE
GASTROENTEROLOGIA, HEPATOLOGIA E NUTRIÇÃO

C E R T I F I C A D O

Certificamos que

FLÁVIA DE ABREU MORAIS; ADRIANA MARIA ALVES DE TOMMASO; GABRIEL HESSEL;
ROBERTO MASSAO YAMADA; MARIA DE FÁTIMA CORREA PIMENTA SERVIDONI; ALEXANDRE
ESTEVES ALMEIDA; LAURA LETÍCIA RAMOS RIFO; ANTÔNIO FERNANDO RIBEIRO

Participaram do 15º CONGRESSO BRASILEIRO DE GASTROENTEROLOGIA PEDIÁTRICA,
19º Congresso Latino Americano e 10º Congresso Ibero Americano de
Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição realizado no período de 26 a 29 de março
de 2014 no Centro de Convenções de Natal - RN.

na qualidade de autores do Pôster: ENVOLVIMENTO HEPATOBILIAR E PANCREÁTICO NA FIBROSE
CÍSTICA POR MEIO DA ULTRASSONOGRAFIA

Natal, 29 de março de 2014.

REALIZAÇÃO/PROMOÇÃO



Eduardo de Silva Vaz

DR. EDUARDO DA SILVA VAZ
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria

Mauro Batista de Moraes

DR. MAURO BATISTA DE MORAIS
Presidente do 15º Congresso Brasileiro
de Gastroenterologia e Hepatologia

Marina Orsi

DR. MARINA ORSI
Presidente da Sociedade Latinoamericana
de Gastroenterologia, Hepatologia e
Nutrição em Pediatría (SLAGNEP)



PC04



CONGRESSO BRASILEIRO DE
**PNEUMOLOGIA
PEDIÁTRICA**

30 de abril a 3 de maio . 2014
Hotel Summerville | Porto de Galinhas | PE

C E R T I F I C A D O

Certificamos que

MARIA DE FÁTIMA SERVIDONI; CARLA CRISTINA GOMES; MARIA ÂNGELA RIBEIRO; FRANCISCO UBALDO VIEIRA JR.; FERNANDO MARSON; ADYLEIA APARECIDA DALBO CONTRERA TORO; JOSE DIRCEU RIBEIRO; ANTONIO FERNANDO RIBEIRO; SÔNJA LORENA; NEIVA DAMACENO; JOAQUIM CARLOS RODRIGUEZ; GIESELA FERRARI; VERA STEPANIAN; JOÃO BATISTA SALOMÃO; SÔNIA CHIBA; MARIA INÊZ FERNANDES; GRUPO DE ESTUDO DO TESTE DO SUOR-SP



Participaram do 14º CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA, realizado no período de 30 de abril a 3 de maio de 2014 em Porto de Galinhas - PE.

na qualidade de autores do Poster Comentado : ESTIMULAÇÃO, COLETA E DOSAGEM DE ELETROLITOS NO TESTE DO SUOR:
CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES CENTROS. **Premiado em 1º lugar**

Porto de Galinhas, 03 de maio de 2014

Eduardo da Silva Vaz
EDUARDO DA SILVA VAZ
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria

Murilo de Brito
MURILO DE BRITO
Presidente do 14º Congresso Brasileiro
de Pneumologia Pediátrica

Poster

ERS International Congress 2014 – Munique, Alemanha - Setembro 2014



Abstract n° (file #): 3294 (855233)

Abstract title: Evaluation of the effectiveness of cyclical and constant current on sweat volume and stimulation for cystic fibrosis diagnoses

Status: Accepted

**ERS** EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY
every breath counts

annual congress

MUNICH 2014

● search in conference programme

● your personal itinerary

Sat 06 Sep. Sun 07 Sep. Mon 08 Sep. Tue 09 Sep. Wed 10 Sep.

	Evaluation of the effectiveness of cyclical and constant current on sweat volume and stimulation for cystic fibrosis diagnoses C. Gomez, M. Servidoni, F. Marson, P. Canavezi, A. Vinagre, C. Pavan, M. Santos-Rodon, E. Costa, A. Ribeiro, M. Ribeiro, F. Vieira Junior, G. Hessel, C. Levy, C. Bertuzzo, S. Lorena, J. Ribeiro (Campinas, Brazil)	
---	---	--

COMPARING β -ADRENERGIC SWEAT SECRETION ASSAY TO TRANSEPITHELIAL POTENTIAL DIFFERENCE MEASUREMENTS IN RECTAL TISSUE BIOPSIES and NASAL POTENTIAL DIFFERENCE MEASUREMENTS

Maria F Servidoni¹, Marisa Sousa², Julie Avolio³, Wan Ip³, Katherine Griffin⁴, Verónica Felício⁵, Carla G Souza¹, Maria A Ribeiro¹, Antônio F Ribeiro¹, José D Ribeiro¹, Margarida Amaral⁵, Elizabeth Tullis⁴, Tanja Gonska³

¹Gastrocentro - Endoscopy Unit and Pediatrics Department, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

²Nova University of Lisbon-Faculty of Medical Sciences/CEDOC, Lisboa, Portugal

³Department of Paediatrics, University of Toronto and Physiology and Experimental Medicine, Research Institute, the Hospital for Sick Children, Toronto, Canada ⁴Department of Medicine, University of Toronto and Division of Respiriology and Keenan Research Centre of Li Ka Shing Knowledge Institute St. Michael's Hospital, Toronto, Ontario, Canada

⁵University of Lisboa - Faculty of Sciences, BioFiG – Center for Biodiversity, Lisboa, Portugal

Objective: To compare the diagnostic accuracy of the recently introduced β -adrenergic sweat secretion to transepithelial potential difference measurements in rectal tissue biopsies (rectal biopsy test) and nasal potential difference measurements (NPD).

Methods: Parallel testing in 2 separate cohorts: cohort 1: sweat chloride, EVAP and rectal biopsy test in 4 healthy controls (HC), 9 heterozygotes (Hz), 9 pancreatic sufficient (CFPS), 10 pancreatic insufficient CF patients (CFPI) and 6 query CF patients; cohort 2: sweat chloride, EVAP and NPD in 3 HC, 4 Hz, 8 CFTR-R, 6 CFPS, 5 CFPI and 10 query CF patients. CFTR function in rectal tissue biopsies was assessed following FSK/IBMX (I-cAMP) plus carbachol (I-CCH) stimulation in a perfused Ussing chamber and in NPD measurements as change in PD between amiloride and low chloride + isoproterenol perfusion ($\Delta I_{Cl/Iso}$).

Results: Preliminary analysis showed that the β -adrenergic sweat secretion distinguished between HC and Hz ($p < 0.001$), Hz and CFTR-R ($p < 0.0001$) and HC/Hz and CFPS ($p < 0.001$) in both cohorts.

Sweat chloride test discriminated between Hz and CFPS ($p < 0.0001$) in cohort 1 and between Hz and CFPS ($p < 0.0001$), CFTR-R and CFPS ($p < 0.01$), CFPS and CFPI ($p < 0.001$) in cohort 2.

Rectal biopsy test didn't show statistical significant differences (ANOVA) between HC and Hz, Hz and CFPS or CFPS and CFPI. However, in direct comparison (t-test) the I-cAMP, which is positive in CFPI and negative in CFPS ($p < 0.0001$), as well as I-CCH, which is biphasic in CF-PS and positive in CF-PI ($p = 0.0001$) differentiated between CFPS and CFPI. Of the 6 query CF patients the rectal biopsy test was inconclusive in 2 and normal in 4. Of the 4 with normal rectal biopsy test, we identified 3 as HC by all 3 tests and 1 as CFTR-R due to low EVAP. In the 2 subjects with inconclusive results sweat chloride was borderline, but normal EVAP ruled out a CF diagnosis.

NPD results showed statistically significant difference between Hz and CFPS ($p < 0.01$), CFTR-R and CFPS ($p < 0.01$). Of the 10 patients with a query CF diagnosis, we identified 2 as HC and 4 as Hz by all 3

tests, 4 as CFTR-related based on the presence of a CFTR-R phenotype, CFTR gene alterations on one allele, borderline sweat chloride and low EVAP results. All 4 had normal NPD results.

mean±sd (n)	Healthy	Hetero	CFTR-R	CFPS	CFPI
I-cAMP ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	-44.5±57.6 (7)	-39.6 ±25.8 (7)		-10.8 ±15.0 (9)	12.0 ±6.7 (10)
β – secretion ratio, cohort 1	0.80±0.2 (8)	0.51±0.2 (9)		0.0±0.0 (9)	0.0±0.0 (10)
NPD $\Delta\text{I}_{\text{Cl}/\text{Iso}}$ (mV)	-27.5±9.8 (5)	-18.2±4.9 (8)	-16.0±9.1 (12)	-5.5±6.0 (6)	-1.5±5.1 (5)
β – secretion ratio, cohort 2	0.87±0.1 (5)	0.49±0.1 (8)	0.13±0.2 (12)	0.0±0.0 (6)	0.0±0.0 (5)

Conclusion: The β -adrenergic sweat secretion test was superior discriminating CFTR functional levels within the milder spectrum of CF disease, whereas sweat chloride, rectal biopsy test and NPD are better discriminators within the severe spectrum. Thus, the β -adrenergic sweat secretion test serves as a valuable adjunctive tool in CF diagnostics.

Supported by CF Canada and CFFT, Project "Ciência Sem Fronteiras" (Brazil).

From: nacfc@cff.org [mailto:nacfc@cff.org]

Sent: Friday, July 18, 2014 1:08 PM

Subject: 2014 NACFC - Accepted Abstract Notification

RE: COMPARING β -ADRENERGIC SWEAT SECRETION ASSAY TO TRANSEPITHELIAL POTENTIAL DIFFERENCE MEASUREMENTS IN RECTAL TISSUE BIOPSIES AND NASAL POTENTIAL DIFFERENCE MEASUREMENTS

Dear Dr.:

We are pleased to inform you that the above-referenced abstract has been accepted for poster presentation during the 2014 North American Cystic Fibrosis Conference to be held October 9-11, 2014 at the Georgia World Congress Center in Atlanta, Georgia. Pre-conference sessions, including Special Classes and Short Courses, are scheduled on Wednesday, October 8. Your abstract will be included in the conference proceedings to be published as a supplement to Pediatric Pulmonology.