

**TÍTOL: VALOR DISCRIMINATORI DE LA MESURA DE LA DIFERÈNCIA DE POTENCIAL NASAL PER VALORAR LA FUNCIO DE LA PROTEÏNA REGULADORA DE LA CONDUCTANCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSI QUÍSTICA PEL DIAGNÒSTIC ETIOLÒGIC DE MALALTS AMB BRONQUIÈCTASIS DIFUSES**

Tesi presentada per optar al grau de Doctor en Medicina per:

**Montserrat Bosque i García**

**Sabadell 2014**

Director: Christian Domingo Ribas

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina, Barcelona 2014



**Facultat de Medicina**

**Christian Domingo i Ribas**, Professor titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), de la Unitat Docent de Parc Taulí,

**CERTIFICA:**

Que la Tesi Doctoral titulada "**VALOR DISCRIMINATORI DE LA MESURA DE LA DIFERÈNCIA DE POTENCIAL NASAL PER VALORAR LA FUNCÍÓ DE LA PROTEÏNA REGULADORA DE LA CONDUCTÀNCIA TRANSMEMBRANA DE LA FIBROSI QUÍSTICA PEL DIAGNÒSTIC ETIOLÒGIC DE MALALTS AMB BRONQUIÈCTASIS DIFUSES**" presentada per Montserrat Bosque i García inscrita al departament de Medicina de la UAB amb el Número de registre 52/09, per optar al grau de doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del tribunal corresponent.

I, perquè així consti als efectes oportuns, signem aquest certificat a Sabadell, cinc de Juny de 2014

Dr. Christian Domingo i Ribas

## **DEDICATÒRIES**

A la meva família , sobre tot al meus pares que gràcies al seu esforç he pogut créixer com a persona i com a metge. I a les tietes que em van fer comprendre la vida.

Als meus fills el Roger i la Marta que sempre m'han recolzat i estimat i m'han donat força per seguir lluitant en els mals moments .

Als meus nets: el Jan, el Lluç i la Mar per tota la tendresa que han sabut fer aflorar en mi.

A la meva germana Isabel perquè sempre ha estat al meu costat i perquè es amb la persona que he compartit els moments mes bons i mes dolorosos de la meva vida.

A la M<sup>a</sup> Teresa ja que aquesta Tesi es també la seva.

I per descomptat al Pacu.

## **AGRAÏMENTS**

Al meu Director de Tesi Dr. Christian Domingo i Ribas que a més de ser el director de la meva tesi es un bon amic amb el que hi passat llargues estones discutint els conceptes fisiopatològics de la Fibrosi Quística en avions i trens i que ha sapigut ordenar, interpretar i donar forma als meus raonaments.

Al Servei de Pediatria de l'Hospital de Sabadell per donarme la oportunitat d'aprendre i estimar la Pediatria i als nens, primer a la Clínica Infantil del Nen Jesús i després a la Corporació Sanitaria Parc Tauli. Molt especialment al Dr Joan Argemi Fontanet i a la Dra Pepi Rivera Luján.

Al meu equip a la Dras Helena Larramona i Laura Valdesoiro per la seva amistat i complicitat, al Dr.Oscar Asensio per tota una vida treballant junts. A les fissios Nuria López i Andrea Valiente per estar sempre al meu costat. A les infermeres Pepi del Bas, Susana Loureda, Carmen Garcia, Carmen Veigas, Susi Ponce de León, Montse Selvas, Maria Piñar, Roser Corcoy i al Carlos Luna per tot el recolçament i no dubtar mai de mi. I molt especialment a la Fina Ramirez.

Al Servei de Pneumologia sobre tot al Dr. Albert Marin, al Dr. Miguel Gallego, al Dr Xavi Pomares, a la Dra. Conchita Montón i a la Sra. Maribel Herranz, per ajudar-me en tot moment i sense demanar-me res a canvi.

Als Drs. Francisco Muñoz López i a la Dra. M<sup>a</sup> Anunciación Martin Mateos per introduir-me en el món de l'Al·lèrgia.

Al José Antonio Fernández per donarme sempre suport i ajut en tot alló que es tan difícil per mi i tan fàcil per ell.

Al Joan Carles Oliva per tot l'ajut que m'ha donat al redactar la part estadística de la Tesi, sempre generós i disposat a donar tot lo que sap.

A la Gemma Torras ,la primera tècnica,que gràcies a la seva disponibilitat i a les ganes d'aprendre vaig poder iniciar el projecte.

Al Servei de Microbiologia del Hospital de Sabadell sobre tot a la Dra. Dolors Mariscal i al Dr. Mateu Espasa

Al personal de la Fundació Parc Taulí sobre tot a la Dra. Coloma Moreno, a la Sra. Antònia Farrés i a la Sra. Anna Igual per animarme en els mals moments i donarme ànims per seguir endavant. També el meu agraïment a la Sra Loli Prados, a la Sra Roser Renom al Sr. Quim Gamisans i al Sr. Xavier Jové per suportarme cada mes.

Als malalts de Fibrosi Quística i a les seves famílies per la seva generositat.

## **PUBLICACIONES I COMUNICACIONES DERIVADES D'AQUESTA TESI**

1. Valor diagnòstic i pronòstic del potencial diferencial nasal en la fibrosi quística. XXXVI Congreso Nacional de la Separ Zaragoza Junio 2003.
2. Utilidad de la determinación del PDN para el diagnóstico de la Fibrosis Quística con test de sudor negativo. XXI Diada Pneumològica. Abril 2003 Barcelona. Millor comunicació.
3. IX Congreso Nacional de FQ. Tenerife, nov. 2007. Papel diagnóstico del test de diferencia potencial nasal en enfermos afectos de bronquiectasias difusas no filiadas.
4. The role played by the NPD en the diagnostic of cystic fibrosis patients with the negativ sweed test. XXVI European Cystic fibrosis Conference, Belfast. Junio 2003.
5. Diagnóstico de las Formas no Clásicas de FQ. Universidad del Aire. Update en FQ. Asma y EPOC. Madrid 26-27 de Octubre 2012.
6. Diferencia de potencia nasal en pacientes con Fibrosis Quística. XXXIII Reunión de la SENP, Mayo 2011.
7. Formas no clásicas de Fibrosis Quística. Necesidad del estudio del Funcionamiento de la CFTR para el diagnóstico. XXXIII Reunión de la SENP, Mayo 2011.
8. Domingo-Ribas C, Bosque-García M. [Nasal potential difference test to diagnose cystic fibrosis]. Arch Bronconeumol. 2006 Jan; 42(1): 33-8. Spanish. PMID: 16426521.

## RESUM

**Introducció:** Avui en dia, el diagnòstic de FQ es basa fonamentalment en la prova de la suor i l'estudi de les mutacions *CFTR*. Les formes no clàssiques i les formes monosimptomàtiques de FQ com les bronquièctasi poden tenir una prova de la suor normal o dubtosa i una o cap mutació de la *CFTR*. Per poder realitzar el diagnòstic de FQ en aquests malalts, s'aconsella utilitzar una prova funcional de la *CFTR* que demostrï "in vivo" de manera fiable el funcionament de la *CFTR*. La prova descrita darrerament i més fiable es la mesura de la diferència de potencial nasal (DPN).

**Objectius:** s'han dividit en dos grans grups. En primer lloc establir els criteris de formació d'un tècnic, constatar la repetibilitat de la prova, determinar la sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN), establir i determinar els valors de referència en el nostre medi. El següent gran objectiu es establir si la DPN pot confirmar o excloure el diagnòstic de FQ o disfunció de *CFTR* en els malalts amb bronquièctasis difuses i prova de la suor no patològica i si la DPN basal pot ser útil com a prova de cribratge en pacients amb bronquièctasi difuses.

### Material i Mètodes

Poblacions estudiades: Controls sans no portadors de mutacions *CFTR*; Fibròtics quístics (FQ clàssica); Pacients adults amb bronquièctasis; Indivíduos sans portadors d'una mutació de *CFTR*. Instrumentalització: prova de la suor, mesura de la diferència de potencial nasal (basal i després de la irrigació amb diferents solucions- amilorida, solució lliure de clor i isoproterenol), estudi genètic.

**Resultats:** població: es varen estudiar respectivament 14, 17, 112 i 30 individus

Primer estudi: El nostre tècnic ha fet 352 determinacions; repetibilitat de la tècnica: s'ha obtingut un coeficient de correlació intraclasse de 0.857. Comparant amb la prova de la suor, la DPN va mostrar una S: 91.7%; E: 80%; VPP: 78%; VPN: 92,3% i es van establir els valors de referència pel nostre laboratori. L'estudi de la DPN (basal més irrigació amb les diferents solucions) va mostrar que la darrera mesura, després de la irrigació amb isoproterenol un increment de DPN entre 1 i 11 mV, permetia diagnosticar de FQ malalts amb BD i prova de la suor no patològica. Un 82% d'aquests malalts tenien mutacions considerades de menor severitat.

**Conclusions:** Hem comprovat que un tècnic que realitzi 350 mesures està ensinistrat per fer la tècnica. La repetibilitat de la tècnica fou excel·lent, la qual cosa permet establir valors de referència per un laboratori en concret. La determinació de la DPN en pacients afectes de BD no filiades permet el diagnòstic de FQ. Els nostres resultats aconsellen la implementació de la mesura de la DPN basal en el algoritme diagnòstic de la FQ.

## ABSTRACT

**Introduction:** nowadays, the diagnosis of Cystic Fibrosis (CF) is based on the sweat test and the presence of characteristic mutations. Non classical forms as well as monosymptomatic patients of CF such as diffuse bronchiectasis can have a sweat test normal or mildly altered and one or none mutation of the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) gen. To achieve a diagnosis of CF, a functional test that shows "in vivo" the activity of the CFTR is recommended. The most recent and reliable test implemented is the measurement of the nasal potential difference (NPD).

**Objectives:** they were divided into two groups. The first one pretended to establish the criteria for the training of a technician to state the repeatability of the test, determine the sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and establish the reference values of the technique in our environment. The second objective was to evaluate whether the NPD measurement can confirm or exclude the diagnosis of CF and/or CFTR dysfunction in patients with diffuse bronchiectasis and normal sweat test as well as to establish its usefulness as a screening test in patients with diffuse bronchiectasis.

### **Material and Methods:**

Population: controls healthy without any mutation of the CFTR; Classic CF (carrying two *CFTR* mutations); Adult patients with diffuse bronchiectasis; Healthy individuals carrying a mutation of CFTR.

Interventions: sweat test, measurement of nasal potential difference (baseline and after irrigation with different solutions: amiloride, chlorine-free solution and isoproterenol), genetic study.

**Results:** population: 14, 17, 112 and 30 individuals were respectively studied. First study: Our technician performed 352 determinations; Repeatability of the technique: an intraclass correlation coefficient (ICC) of 0.857 was obtained. Comparing with the sweat test, the DPN showed a S: 91.7%; E: 80%; PPV: 78%; NPV92.3%. We could establish the reference values of the NPD technique for our laboratory. Second study: the different NPD measurements (the baseline and those obtained after irrigation with different solutions) showed that the last measurement, the one obtained after irrigation with isoproterenol, in the group of patients with and increment of NPD values between 1 and 11 mV allowed a diagnosis of CF in patients with diffuse bronchiectasis and a normal sweat test. Eighty two percent of this group of patients had CFTR mutations, most of which considered of less severity.

**Conclusions:** We have found that a technician training is achieved after 350 NPD measurements. The repeatability of the technique was excellent, allowing to establish reference values for a particular laboratory. The measurement of NPD in patients with



diffuse bronchiectasis allows a diagnosis of CF. Our results recommend the implementation of the NPD measurement for the diagnosis of CF.

## **INDEX**

### **1 INTRODUCCIÓ**

#### **1.1** Història de la Fibrosi Quística

#### **1.2** Concepte i definició

#### **1.3** Epidemiologia

##### 1.3.1 Prevalença

##### 1.3.2 Distribució per races i sexes

##### 1.3.3 Genètica

##### 1.3.4 Supervivència i estil de vida

#### **1.4** Fisiopatologia de la malaltia

##### 1.4.1 Histologia de l'epiteli ciliat

###### 1.4.1.1 Descripció de les cèl·lules

###### 1.4.1.2 Descripció de la ultraestructura dels cilis

###### 1.4.1.3 Batec ciliar

##### 1.4.2 Composició del moc

###### 1.4.2.1 Capa gel i capa sol

###### 1.4.2.2 Estructura mucociliar i desplaçament del moc

##### 1.4.3 Estructura i funció de la CFTR

##### 1.4.4 Circulació dels ions a través de la cèl·lula

##### 1.4.5 Fisiopatologia de la malaltia

###### 1.4.5.1 Defecte genètic

###### 1.4.5.2 Defecte de funcionament de la CFTR

###### 1.4.5.3 Alteració iònica resultant: clor, sodi i aigua

###### 1.4.5.4 Infecció, colonització bacteriana i biofilm

###### 1.4.5.5 Resum de la fisiopatologia de la fibrosi quística

- 1.5** Manifestacions Clíniques
  - 1.5.1 Pulmonars
  - 1.5.2 Gastrointestinals
  - 1.5.3 Endocrinològiques
  - 1.5.4 Musculoesquelètiques
  - 1.5.5 Aparell reproductor
  
- 1.6** Diagnòstic
  - 1.6.1 Criteris diagnòstics
  - 1.6.2 Prova de la suor
  - 1.6.3 Prova de la diferència de potencial nasal
  - 1.6.4 Diagnòstic molecular
  - 1.6.5 Diagnòstic d'insuficiència pancreàtica
  - 1.6.6 Cribratge neonatal i diagnòstic prenatal
    - 1.6.6.1 Cribratge neonatal
    - 1.6.6.2 Diagnòstic prenatal
  
- 1.7** Formes Clíniques de la fibrosi quística
  - 1.7.1 Forma clàssica
  - 1.7.2 Formes no clàssiques
  - 1.7.3 Malalties relacionades amb la disfunció de la CFTR
    - 1.7.3.1 Aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica
    - 1.7.3.2 Rinosinitis crònica
    - 1.7.3.3 Bronquièctasis difuses
  
- 1.8** Diferència de potencial nasal
  - 1.8.1 Breu història de la tècnica
  - 1.8.2 Concepte fisiopatològic que avalua
  - 1.8.3 Descripció genèrica de la tècnica
    - 1.8.3.1 Dispositiu
    - 1.8.3.2 Material fungible
    - 1.8.3.3 Solucions per irrigació
    - 1.8.3.4 Calibratge del voltímetre
    - 1.8.3.5 Preparació del malalt
    - 1.8.3.6 Procediment de mesura
    - 1.8.3.7 Interpretació de resultats numèrics i gràfics
  - 1.8.4. Interès clínic

**2 JUSTIFICACIÓ GENÈRICA DELS ESTUDIS**

**3 HIPÒTESI GENERAL**

## **4 PRIMER ESTUDI: APRENTATGE DE LA TÈCNICA I DETERMINACIÓ DELS VALORS DE REFERÈNCIA**

### **4.1** Justificació

### **4.2** Hipòtesi

### **4.3** Objectius

### **4.4** Material i Mètodes

#### 4.4.1 Població: classificació dels malats en grups

4.4.1.1 Controls sans no portadors de mutacions *CFTR* (Grup A)

4.4.1.2 Fibròtics quístics (FQ clàssica), portadors de 2 mutacions *CFTR* (Grup B)

4.4.1.3 Pacients adults amb bronquièctasis difuses portadors d'una mutació *CFTR* (Grup C)

4.4.1.4 Pacients adults amb bronquièctasis difuses no portadors de cap mutació de la *CFTR* (Grup D)

4.4.1.5 Individus sans portadors d'una mutació de *CFTR* (Grup E)

#### 4.4.2 Prova de la diferència de potencial nasal

#### 4.4.3 Protocol d'estudi d'individus per diferenciació de grups

#### 4.4.4 Anàlisi estadística

### **4.5** Resultats

#### 4.5.1 Resultats de la tècnica

4.5.2 Valors de referència de la mesura de la deiferència de potencial nasal dels diferents grups

### **4.6** Discussió

### **4.7** Conclusions

## **5. SEGON ESTUDI: UTILITAT DE LA MESURA DE DIFERÈNCIA DE POTENCIAL NASAL EN FIBRÒTICS QUÍSTICS QUE PRESENTEN UN FENOTIP DE BRONQUIÈCTASIS DIFUSES IDIOPÀTIQUES**

### **5.1** Justificació

### **5.2** Hipòtesi

### **5.3** Objectius

### **5.4** Material i Mètodes

#### 5.4.1 Població: Classificació dels malalts en grups

##### 5.4.1.1 Fibròtics quístics (grup A)

##### 5.4.1.2 Pacients adults diagnosticats de bronquièctasis difuses i idiopàtiques (grup B)

##### 5.4.1.3 Pacients sans portadors d'una mutació *CFTR* (grup C)

##### 5.4.1.4 Controls sans respecte la malaltia FQ (grup D)

#### 5.4.2 Protocol d'estudi

##### 5.4.2.1 Prova de la suor

##### 5.4.2.2 Estudi genètic

##### 5.4.2.3 Prova de la diferència de potencial nasal basal

##### 5.4.2.4 Prova de la diferència de potencial nasal basal i amb les diferents solucions post irrigació de la mucosa nasal

#### 5.4.3 Anàlisi estadística

### **5.5** Resultats

#### 5.5.1 Característiques demogràfiques

#### 5.5.2 Dades analítiques

##### 5.5.2.1 Anàlisi genètic

##### 5.5.2.2 Prova de la suor

#### 5.5.3 Resultats de la diferència de potencial nasal per grups

##### 5.5.3.1 Basal

##### 5.5.3.2 Irrigació amb solució d'amilorida

##### 5.5.3.3 Irrigació amb solució lliure de Clor i isoproterenol

5.5.4 Identificació de subpoblacions en el grup de bronquièctasis idiopàtiques en funció de la diferència de potencial nasal basal.

5.5.4.1 Basal

5.5.4.2 Irrigació amb solució d'amilorida

5.5.4.3 Irrigació amb solució lliure de Clor i d'isoproterenol

5.5.4.4 Mutacions *CFTR* dels malalts amb bronquièctasis difuses, prova de la suor normal i valor de la DPN patològica

5.5.4.5 Prova de la suor

5.5.4.6 Valors de referència de la DPN en els malalts amb FQ i controls sans

## **5.6** Discussió

5.6.1 Consideracions metodològiques

5.6.2 Diagnòstics i Classificació de la població en grups

5.6.3 Consideracions sobre la corba d'aprenentatge de la tècnica de la diferència de potencial nasal

5.6.4 Interpretació de resultats de la diferència de potencial Nasal basals i post-irrigació de la mucosa nasal

5.6.5 Valoració de l'estudi genètic dels malalts amb BDI

## **5.7** Conclusions

# **6 DISCUSIÓ GENERAL**

# **7 APLICACIONS CLÍNIQUES**

# **8 BIBLIOGRAFIA**

# **9 ABREVIATURES I UNITATS**

# **10 ANNEXES**

**10.1** Informe del CEIC

**10.2** Finançament

**10.3** Taules de resultats

## 1 INTRODUCCIÓ

### 1.1 Història de la Fibrosi Quística

Les primeres observacions Clíniques de la Fibrosi Quística (FQ) es coneixen des de l'Edat Mitjana, quan es va observar que la presència de la suor especialment salada es relacionava amb una esperança de vida molt curta: "El nen a qui al besar-li el front te gust salat, mor molt aviat". En el fons aquesta observació clínica il·lustra la relació entre la disfunció de la glàndula sudorípara i una supervivència molt breu.



Posteriorment, Carl von Rokitansky va descriure l'any 1838 un cas de mort fetal amb peritonitis meconial, una complicació de l'íli meconial associada a la Fibrosi Quística (FQ).

Al 1934 Dorothy Andersen (figura 1) va descriure les troballes anatomopatològiques i clíniques dels malalts amb FQ i va denominar aquesta entitat per primer cop a la literatura amb el nom de "fibrosi quística del pàncrees" (1) per la presència dels quists i fenòmens de fibrosi del teixit pancreàtic que presenten aquests malalts.

Figura 1. Dorothy Andersen

Una dècada més tard, Febrer va proposar el terme de "mucoviscidosi", al considerar que la hiperviscositat del moc era la causa fonamental de les alteracions que presentaven els malalts afectes de FQ i que la pèrdua de funció i fibrosi de la glàndula pancreàtica observades eren fets secundaris al bloqueig dels conductes excretors degut a les secrecions inhabitualment espesses (2). Fins pràcticament l'any 1953 el diagnòstic de FQ es feia en base a les dades clíniques (pneumopatia crònica acompanyada d'insuficiència respiratòria molt greu més insuficiència pancreàtica). En aquella època no es disposava de tècniques de laboratori que poguessin donar suport a la sospita clínica de FQ. Durant aquell any, Di Sant'Agnese va demostrar que la causa del xoc hiponatrèmic que van presentar malalts amb clínica sospitosa de FQ durant l'onada de calor que va patir la ciutat de Nova York era deguda a l'elevada concentració de Clor excretada per la suor (3).

Al 1959, Gibson i Cooke van desenvolupar una tècnica per determinar la concentració d'electròlits en la suor (4). A partir d'aquest moment, la prova de la suor es va considerar com el "Gold-Standard" pel diagnòstic de la FQ.

L'any 1964 és quan es va començar a protocolitzar el tractament nutricional, el tractament de la sobreinfecció bacteriana, el de l'obstrucció del flux aeri i es va reconèixer la importància de la relació entre la nutrició i l'estat físic dels pacients amb FQ.





Figura 2. Drs. Tsui i Collins

No va ser fins l'any 1985 quan un grup d'investigadors coordinats per Tsui a Toronto i Collins a Michigan (figura 2) van comunicar el descobriment del gen responsable de la malaltia després d'analitzar la seqüència d'ADN en controls sans i en pacients amb FQ (5), identificant i localitzant la mutació responsable de la FQ al braç llarg del cromosoma 7 humà, concretament a la regió 7q 31-32 (figura 3).

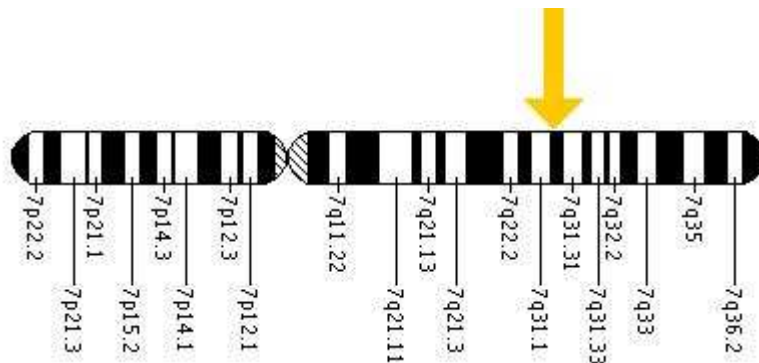


Figura 3. Cromosoma 7. Regió 7q 31-32

Quatre anys més tard, a l'agost de 1989, es va poder identificar l'ADN de la regió 7q31-32 mitjançant estratègies de "walking and jumping" (6) passant a denominar-se el gen de la FQ com a Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (*CFTR*), es a dir gen regulador de la conductància transmembrana de la FQ (7). Des d'un punt de vista terapèutic, cal assenyalar que al 1988 Joel Cooper a Toronto (8) va dur a terme el primer trasplantament bipulmonar amb èxit en un malalt amb FQ.

L'any 1991 es va descriure la relació entre el defecte de la *CFTR* i el transport anormal de l'ió clor. Al 1994 es va dissenyar el primer mucolític específic pel tractament de la FQ i finalment al 1995 Knowles i col.laboradors descriuen una nova tècnica diagnòstica: la mesura de la diferència de potencial nasal (DPN) (9). A l'inici es va concebre com un mètode complementari pel diagnòstic de la FQ i del dèficit funcional de la *CFTR*. A mesura que la tècnica s'ha anat estandarditzant la DPN s'ha anat utilitzant, no solament per valorar la funció *CFTR*, sinó també per la monitorització de l'eficàcia de les noves teràpies que tenen com a finalitat potenciar o corregir la quantitat de la proteïna *CFTR*.

A l'any 1997, es va dissenyar el primer antibiòtic per via inhalatòria. Posteriorment es publicaren els primers estudis sobre l'eficàcia del tractament amb sèrum salí hipertònic. A partir del descobriment del gen, comencen a aparèixer les primeres publicacions sobre el tractament de la FQ amb teràpia gènica (10-11). Posteriorment cap al 2003, s'aprofundeix en les possibilitats terapèutiques d'unes noves molècules immunomoduladors de la proteïna CFTR i se'n publiquen els primers treballs (12). Aquestes molècules es diferencien en potenciadores i correctores de la CFTR (13-14).

## **1.2** Concepte i definició

La FQ és la malaltia genètica més freqüent de la raça caucàsica. Es presenta en forma d'herència autosòmica recessiva i amb clínica multisistèmica (malaltia sino-pulmonar crònica, insuficiència pancreàtica, infertilitat masculina i uns valors de clor a la suor dels malalts elevats). El gen de la *CFTR* està localitzat al braç llarg del cromosoma 7, té una mida de 250 kilobases, compren 27 exons, i codifica una proteïna de 1480 aminoàcids anomenada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Aquesta proteïna actua com a canal de clor. La FQ fisiopatològicament es caracteritza per un transport anòmal de l'epiteli de la via aèria condicionant una alteració en la permeabilitat iònica de la membrana cel·lular de sodi i de clor secundària al defecte del gen que codifica la síntesi de la CFTR. La proteïna codificada (CFTR) es localitza a la membrana apical de les cèl·lules epitelials de la via aèria, intestinals, reproductives, hepàtiques, renals i de les glàndules sudorípares. La gravetat de la malaltia depèn de les mutacions de la CFTR, dels gens modificadors i dels desencadenants del medi ambient (15). La gravetat de la malaltia es variable, anant des de casos de nens amb mort prematura fins a casos de malaltia crònica de supervivència fins l'edat adulta.

## **1.3** Epidemiologia

### **1.3.1.** Prevalença

Com hem dit anteriorment, la FQ es la malaltia genètica més freqüent de la raça caucàsica. La seva incidència oscil·la entre 1 de cada 2.500 nascuts vius a països anglosaxons i 1 per cada 5.000 nounats als països mediterranis.

En l'actualitat a Catalunya la incidència és de 1/5.200 nounats (16). D'acord amb aquestes dades, la xifra de malalts a Catalunya ha d'ésser d'un mínim de 1.200 pacients. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) classifica la FQ com una "malaltia rara" (es a dir aquella malaltia amb una incidència de menys de 1/10.000 habitants) (17).

### **1.3.2.** Distribució per races i sexes

Des d'un punt de vista racial, s'ha observat que la FQ, tot i que pot afectar a totes les races, és més freqüent a la raça caucàsica. Entre els hispans nord-americans, els afroamericans i els asiàtics la prevalença sembla ser inferior. Pel que fa la distribució per sexes, la malaltia es diagnostica tant en homes com en dones, mostrant els primers una millor expectativa de vida per motius desconeguts (18).

### 1.3.3. Genètica

Es coneixen a l'actualitat més de 1900 mutacions del gen de la *CFTR* (19) dividides en 6 classes. Per ser considerats malalts, els individus han de ser portadors de dues mutacions, una en cada al·lèl. Els portadors d'una mutació en principi són individus sans, que poden transmetre la malaltia però no patir-la. La freqüència de portadors sans és molt elevada a la població general de manera que 1 de cada 25 persones és portadora d'una mutació per la FQ (20). La població malalta de FQ es divideix en dos grups: el grup portador de dues mutacions iguals (homozigots) i el portador de dues mutacions diferents (malalts heterozigots).

En quant als homozigots, la prevalença als Estats Units és 1 de cada 28.2 malalts. En algunes poblacions d'altres races, la prevalença és més baixa. Per exemple, entre els jueus Ashkenazi és 1 de cada 30 (21) i en els afroamericans es de 1 de cada 60 (22). Les mutacions varien en funció de la distribució geogràfica de les poblacions. La mutació més freqüent en el món és la delta-F-508. La freqüència de la delta F-508 s'estima 1/200 entre els suecs, 1/143 entre els lituans i 1/38 en el danesos (23).

### 1.3.4 Supervivència i estil de vida

La supervivència dels pacients afectes de FQ ha anat millorant durant el transcurs dels anys. Així la mitjana de la supervivència a l'any 1959 era de 6 mesos i al 2008 era de 37,4 anys (rang entre 33,7-40 anys). Als països industrialitzats s'espera que seguint els resultats observats en la darrera dècada (figura 4) (24) la supervivència dels nens nascuts a l'any 2012 continuï augmentant .

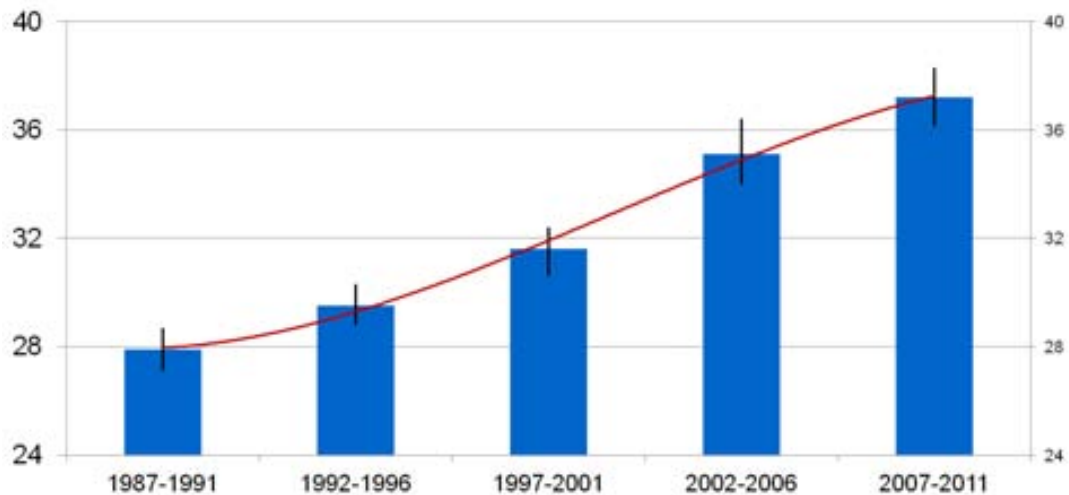


Figura 4. Supervivència malalts amb FQ (24).

La Fundació Americana de FQ calcula que el 50 % dels malalts nascuts a partir del 2012, tindran una supervivència superior al 50 anys. Això serà degut als programes de cribratge neonatal, a la creació de Unitats de Referència i al millor compliment del tractament. Aquesta malaltia afecta a la qualitat de vida dels malalts i modifica notablement el seu estil de vida de manera que la Fundació Americana va publicar a l'any 2008 les següents dades:

- el 91% havien finalitzat els estudis secundaris i el 54% accedit a la Universitat.
- el 12,6% dels adults no podien treballar i el 10% estaven a l'atur.
- el 50% eren solters i el 36% vivien en parella.
- Hi van haver 191 gestacions en dones amb FQ.

Als països de tercer món, en l'actualitat, la supervivència no supera els 10 anys.

## 1.4 Fisiopatologia de la malaltia

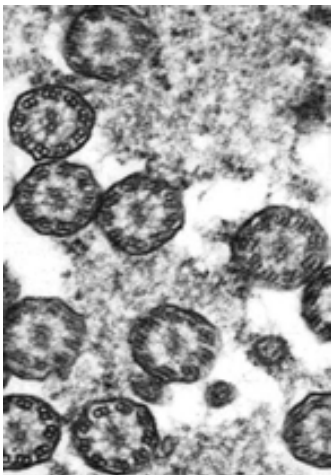
### 1.4.1 Histologia de l'epiteli ciliat

#### 1.4.1.1 Descripció de les cèl·lules

L'epiteli ciliat bronquial és un epitel·li unicel·lular amb cèl·lules que tenen una base que reposa sobre una membrana basal i una part que està en contacte amb la llum bronquial. Aquesta part té uns cilis encorats a la seva superfície encarregats de moure el moc com veurem posteriorment (Figura 5).



Figura 5. Cèl·lula ciliada



#### 1.4.1.2 Descripció de la ultraestructura dels cilis.

Els cilis estant dotats al seu interior d'uns microtúbuls formats per proteïnes que conformen un esquelet que descrivim a continuació.

Un tall transversal de la part superior de l'epitel·li ciliat ens mostra la secció d'un conjunt de cilis (Figura 6).

Figura 6. Microfotografia que mostra la secció transversal d'un conjunt de cilis.

Una visió a major augment d'aquestes seccions ens mostra la ultraestructura normal dels cilis (Figura 7). Es pot observar la presència d'un parell de microtúbuls centrals i nou parells de microtúbuls

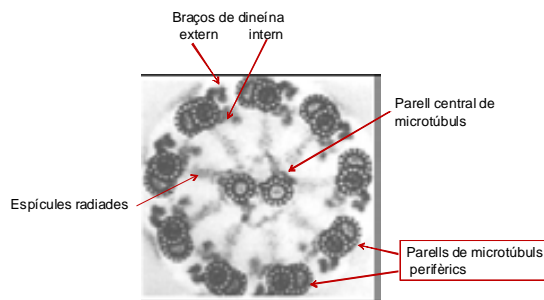


Figura 7. Estructura normal d'un cil.

perifèrics que conformen l'anomenada estructura 9+2. Per mantenir aquesta arquitectura, és necessari que hi hagi els anomenats braços de dineína que fixen els parells de microtúbuls externs i les espícules radiades (radial spokes) que fixen el parell central. En la clínica, aquests microtúbuls poden presentar alteracions en població sana (< 1% dels cassos). Existeixen també una sèrie d'alteracions inespecífiques que poden ser degudes a infeccions recents.

#### 1.4.1.3 Batec ciliar

Quan es produeix el batec ciliar fisiològic de les cèl·lules de l'epiteli ciliat bronquial, els cilis s'han de moure sempre en el mateix sentit per que el batec sigui efectiu. Aquest batec es genera amb els cilis inclosos en la capa sol (Figura 8).



Figura 8. Aquest dibuix mostra les dues capes que formen l'estructura del moc, la superior o capa gel i la inferior o capa sol. En l'interior d'aquesta última és on es troben els cilis que al moure's (batec ciliar), provoquen una ona que avança en un mateix sentit i que afavoreix el desplaçament de la capa superior o capa gel.

#### 1.4.2 Composició del moc

En tota la porció de conducció de la via aèria trobem glàndules caliciformes secretores de moc amb microvellositats en la seva superfície luminal que s'intercalen entre les cèl·lules epitelials. Per sota d'aquest epiteli trobem tres tipus de glàndules:

- Glàndules mucoses que segreguen moc que complementa la secreció de les glàndules caliciformes (són la majoria).
- Glàndules que contenen grànuls basòfils
- Glàndules seroses que contenen grànuls eosinòfils

En condicions normals, la mucosa respiratòria produeix petites quantitats de moc que són drenades a l'exterior. En el drenatge d'aquesta mucositat així com de les impureses atrapades en ella, intervenen d'una banda els cilis de l'epiteli bronquial i per una altra la pròpia estructura del moc. La secreció bronquial és un component de l'aparell mucociliar al formar una unitat harmònica amb el cili. Els principals components de la secreció bronquial són l'aigua (95%), glicoproteïnes àcides (2%), lípids (0,5-1%) i altres proteïnes en menor proporció.

#### 1.4.2.1. Capa gel i capa sol

La més superficial o fase gel té, com el seu nom indica, consistència de gel. Conté la major part de glicoproteïnes. Està en contacte amb la llum bronquial i és transportada pel moviment ciliar. La part profunda, coneguda com fase sol, està en contacte amb la zona apical de les cèl·lules epitelials, és més rica en aigua i conté un tensioactiu provinent del sistema alveolar que assegura la capacitat de lliscament i l'efecte antiadhesiu. En el seu interior es troben els cilis de l'epiteli. Existeixen finalment unes glicoproteïnes que compleixen la funció de sustentació dintre de l'estructura del moc.

#### 1.4.2.2 Estructura mucociliar i desplaçament del moc

El moc té unes característiques físiques (viscositat, tixotropia, elasticitat i plasticitat) de les quals l'elasticitat i la viscositat són les més importants, doncs permeten atrapar les partícules i ascendir contra la gravetat. La combinació d'aquestes propietats determina l'eficàcia del transport ciliar.

La viscoelasticitat consisteix en el lliscament del moc per a després retornar a la seva forma en una posició diferent a la inicial i depèn principalment del contingut en aigua i de les glicoproteïnes o mucines d'elevat pes molecular. Existeixen tres tipus de mucines:

- Sialomucines: són lleugerament àcides, riques en grups carboxil.
- Sulfomucines: són molt àcides, riques en grups sulfat.
- Fucomucines: són neutres, riques en grups metilo.

Aquestes molècules s'agreguen i entrecreuen per formar una matriu tridimensional mitjançant diverses forces: ponts d'hidrogen, enllaços iònics i enllaços covalents. Els ponts d'hidrogen (febles) determinen les propietats viscoses; els enllaços iònics i covalents (més forts) determinen l'elasticitat i la viscositat. Com més àcida és la secreció, major és la seva viscoelasticitat. Finalment, ja hem comentat anteriorment (figura 8) com es desplaça el moc quan hi ha un funcionament correcte de l'estructura mucociliar.

#### 1.4.3 Estructura i funció de la CFTR

La CFTR es una proteïna que pertany a les anomenades famílies "ABC transportadores" (adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) transporters family). És una proteïna politòpica complexa que conté 1480 aminoàcids (figura 9 i figura 10). La seva estructura consta de dues parts simètriques i homòlogues anomenades dominis transmembrana (MSD -1 i MSD-2) que són de tipus hidrofílic i una regió carboxi-terminal situada a la membrana apical. Cada domini està format de sis parts o hèlices en

contacte amb l'espai extracel·lular i una regió hidrofílica en contacte amb el citosol anomenada NBD (nucleotide-binding domain). Els NBD de cada domini MSD s'uneixen a una estructura central o domini regulador central anomenat domini R (R-domain). Aquest domini central o regulador, connecta les dues meitats de CFTR.

La CFTR no fosforilada no s'obre o bé ho fa amb gran lentitud. Per activar-se, la CFTR necessita una única fosforilació del domini R via protein-kinasa. L'activitat de la CFTR es governada pels dos dominis NBD que regulen la obertura i el tancament del canal per una hidròlisi d'ATP. Cada part o hèlix dels dominis transmembrana conformen un por que permet el pas del clor. La regió carboxi-terminal està en contacte amb un número molt important de proteïnes. Aquesta associació amb les diferents proteïnes influencia les funcions de la CFTR (conductància, regulació d'altres canals, transducció de senyal i localització a la membrana apical) (25). Un cop acabat aquest procés, la CFTR està capacitada per permetre que els fluxos d'anions passin a través del por del canal (figures 9, 11 i 12). La CFTR és un dels canals secretors de clor ( $\text{Cl}^-$ ) i de ions bicarbonats més importants. La CFTR és un canal, no una bomba doncs ha de romandre oberta als dos cantons de la membrana cel·lular per permetre la difusió dels ions a favor d'una diferència de potencial. La proteïna CFTR és la única proteïna ABC que és un canal iònic. Però per altra banda té un comportament de transportador de  $\text{Cl}^-$  ja que necessita energia per poder-se activar (26-27). A més també regula la funció d'altres proteïnes transmembrana i d'altres canals iònics com el de sodi i de calci. En individus normals, la CFTR disminueix l'expressió dels canals epitelials de sodi (ENaC), dels canals de clor dependents del calci i afavoreix l'efecte dels canals rectificadors de clor.

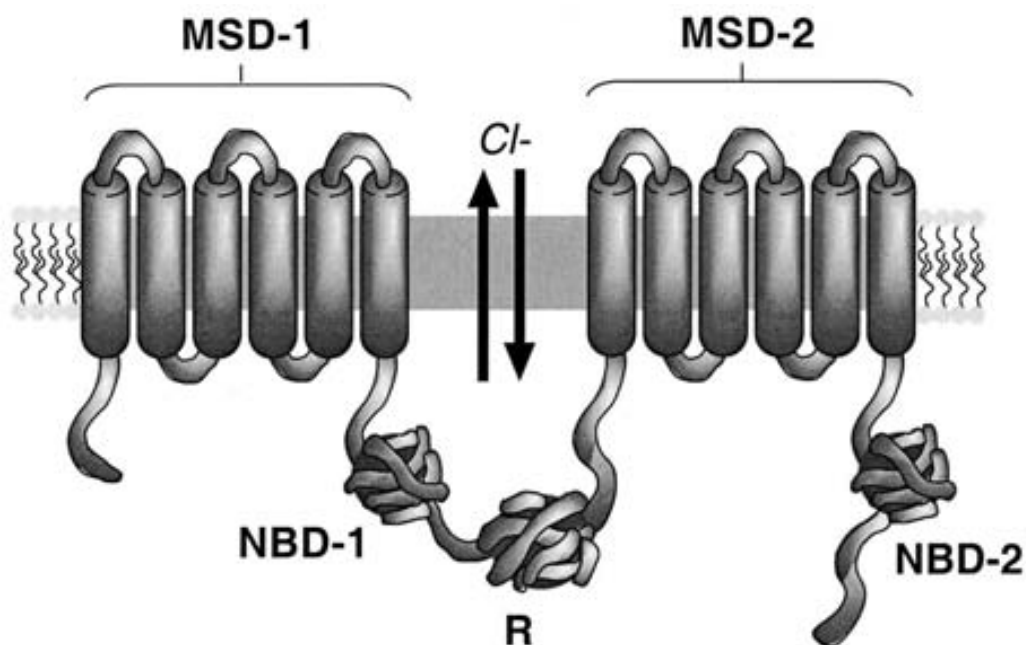


Figura 9. Estructura bidimensional i esquemàtica de la CFTR en la que es poden observar els diferents dominis: MSD-1 i 2, 2 NBD i el domini central o regulador (R).

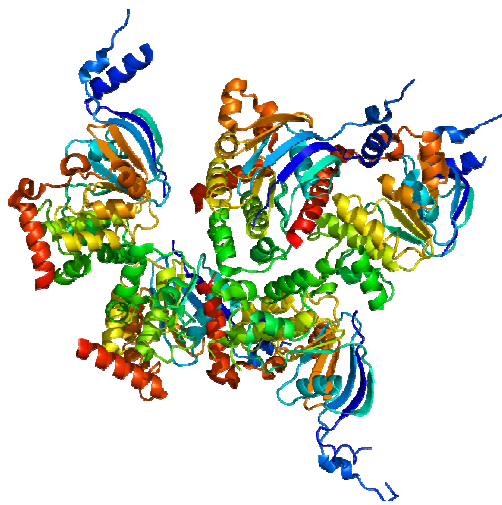


Figura 10. Estructura tridimensional de la CFTR

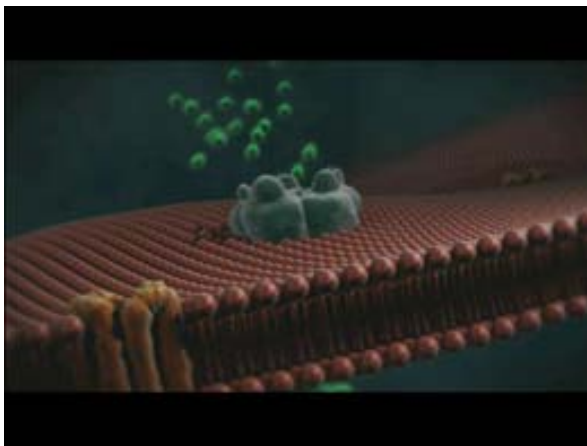


Figura 11. Vista de la CFTR com a proteïna transmembrana

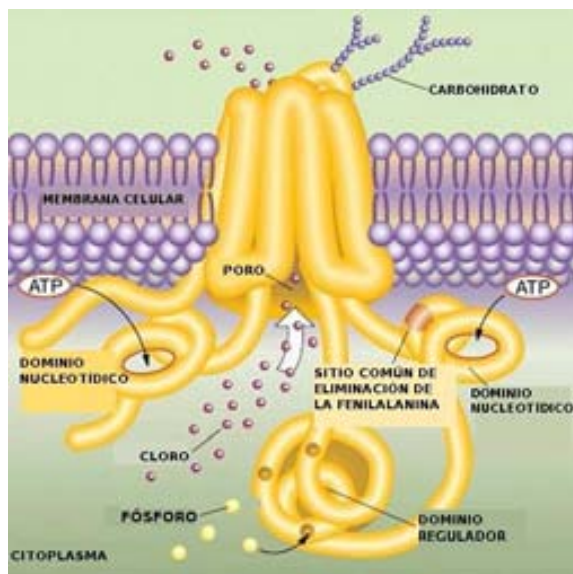


Figura 12: Vista de la CFTR. Fosforilització del domini regulador i hidròlisi de l'ATP dels NBD. Pas del clor pels pors.



Aquestes proteïnes de membrana politòpiques es sintetitzen al reticle endoplasmàtic (RE). Per poder ser funcionant, sortir del reticle endoplasmàtic i arribar fins la membrana basal de la cèl·lula ha de sofrir en primer lloc un plegament (folding). Gràcies a aquest plegament, es capaç de sortir del RE. Posteriorment, les xaperons doten la CFTR d'una resistència a les proteases de manera que la proteïna pot arribar a l'aparell de Golgi sense patir cap degradació. A l'aparell de Golgi produeix una glicosilació que transforma la CFTR en una molècula madura capaç d'arribar a la part apical de la membrana cel·lular i sintetitza la regió carboxi-terminal (figura 13). Finalment, un cop a la membrana cel·lular, la CFTR per poder funcionar precisa una única fosforilització via protein-kinasa que li permet obtenir el canvi conformacional necessari per ser activa.

La CFTR te com a funció ser un canal de clor i es troba localitzada a la membrana basal de les cèl·lules epitelials de les vies aèries, glàndules sudoríparaes, epiteli intestinal, l'aparell reproductor, hepàtic i renal

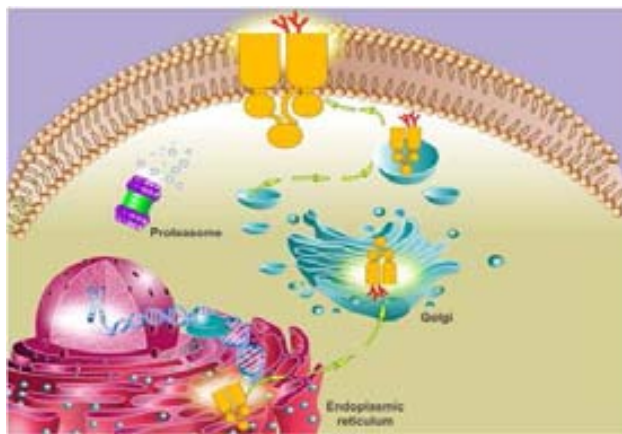


Figura 13. Trajecte (en verd) de la CFTR des del RE fins l'aparell de Golgi i des d'aquest a la membrana basal de les cèl·lules epitelials.

#### 1.4.4 Circulació dels ions a través de la cèl·lula epitelial

Els ions sodi ( $\text{Na}^+$ ), clorur ( $\text{Cl}^-$ ) i bicarbonat circulen per la cèl·lula epitelial bronquial, mitjançant dos mecanismes: el de secreció i el d'absorció. El  $\text{Cl}^-$  entra a la cèl·lula epitelial per la membrana basolateral gràcies a uns cotransportadors, travessa la cèl·lula epitelial i es secretat a la llum bronquial a través de la membrana apical per la CFTR pels canals de clor dependents del calci i pels canals rectificadors de clor. Els ions de  $\text{Na}^+$  són absorbits i secretats a través de la membrana basolateral per la bomba  $\text{Na-K-ATPasa}$ . El  $\text{Na}^+$  va cap a la llum bronquial pels espais intercel·lulars (figura 14), es absorbit cap a l'interior de la cèl·lula pel canal epitelial de sodi (ENaC).

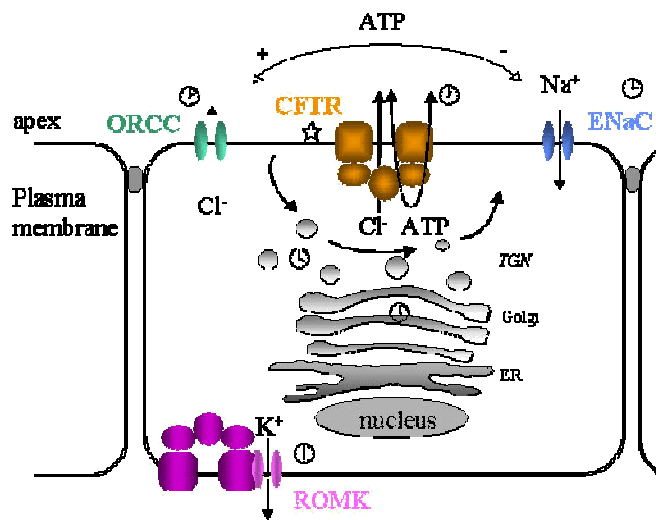


Figura 14. Secreció de Cl<sup>-</sup> i reabsorció de Na<sup>+</sup> a la membrana apical. Es poden observar els canals rectificadors de clor (ORCC) i els canals epitelials de sodi (ENaC).

#### 1.4.5 Fisiopatologia de la malaltia

##### 1.4.5.1 Defecte genètic

Els avenços en el coneixement de les alteracions genètiques han permès importants millores en el coneixement de la fisiopatologia de la FQ i en la descripció del defecte bàsic de la malaltia. L'alteració genètica consisteix en el compromís en la codificació de la proteïna (CFTR) que actua com a canal de clor (figura 15).

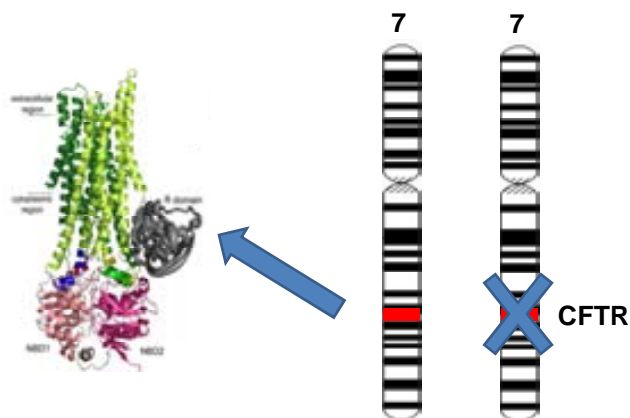


Figura 15. El trastorn genètic fa que la codificació de la CFTR sigui inadequada i per tant el funcionament de la proteïna patològica.

La CFTR, en condicions normals, es localitza a la membrana apical de les cèl·lules epitelials secretores (aparell respiratori, digestiu, reproductores i de glàndules sudorípores<sup>9</sup>. L'absència d'aquesta proteïna condiona un defecte en la permeabilitat dels ions, produint un defecte de la secreció del ion clorur i una hiperabsorció de sodi (Na<sup>+</sup>), ocasionant una desregulació dels fluids i de la sal a través de la membrana cel·lular (28). El coneixement de les mutacions ha permès correlacionar la funció de la CFTR amb l'expressió clínica de la malaltia (correlació fenotip/genotip).

S'han suggerit sis mecanismes moleculars (taula 1) que expliquen la fisiopatologia molecular del canal de clor segons cada mutació (29). El mecanisme molecular està directament lligat a la quantitat de proteïna sintetitzada. Les mutacions que determinen una disminució de la funció de la CFTR menor a l'1 per cent de l'activitat normal condueixen a un quadre clínic sever que inclou insuficiència pancreàtica. Aquelles que cursen amb una activitat entre 1 al 4% determinen afectació pulmonar sense compromís del pàncrees. Quan l'activitat del canal és superior al 4,5%, presenten una única manifestació clínica de la malaltia, com ara l'absència congènita de conductes deferents (ACCD), pancreatitis recurrent o bronquièctasi difuses. En la taula 1 es resumeixen aquests mecanismes i es relacionen amb les mutacions responsables. Segons la quantitat de proteïna sintetitzada s'han classificat les mutacions en classes de la I a la VI.

<b>Clasesesse</b>	<b>Fisiopatologia molecular</b>	<b>Mutació associada</b>
<b>I</b>	Absència de síntesi de proteïna CFTR	G542X
<b>II</b>	Processament defectuós de la proteïna	DF508, N1303K
<b>III</b>	Obertura defectuosa del canal de Clor	G551D
<b>IV</b>	Transport defectuós de la corrent de Cl-	R117H, R334W
<b>V</b>	Reducció de la síntesi de ARNm	3120+1G->A, 3848+10 kb C-> T
<b>VI</b>	CFTR inestable per una proteïna truncada	4326 del TC

Taula 1. Relació entre fisiopatologia molecular i classe de mutació.

Les mutacions de classe I i II solen associar-se amb insuficiència pancreàtica mentre que les altres quatre classes de mutacions (III, IV, V i VI) presenten una gran variabilitat de presentació clínica.

#### 1.4.5.2 Defecte de funcionament de la CFTR

En els malats amb FQ, la proteïna CFTR no està present o no funciona adequadament. La base del defecte de la FQ es la disfunció de la CFTR, que condiona la discapacitat de la regulació del canal de clor situat a membrana apical de les cèl·lules epitelials produint una desregulació en la secreció de ions de clor, ions bicarbonat i de petites quantitats d'altres ions. Això condiona una manca de secreció de Cl<sup>-</sup> i conseqüentment una hiperabsorció de Na<sup>+</sup> (figura 16a i 16b). La impermeabilitat al clor de les membranes cel·lulars de l'epiteli ciliat en els malats amb FQ no es produeix solament per una absència completa del canal de clor dependent de la CFTR, sinó també a causa d'un trastorn de l'activació d'altres

canals de clor com ara els canals intracel·lulars com els canals de clor dependents del calci i els canals rectificadors de clor. Probablement els canals de clor dependents del calci no s'alteren tant i poden compensar una part la secreció defectuosa de clor. La secreció dels fluids per les cèl·lules de les glàndules acinars de la submucosa de la via aèria es dirigeix pel transport actiu de ions clorur. En canvi els ions bicarbonats regulen els fluids en altres cèl·lules epitelials com les pancreàtiques i les del intestí prim. El defecte de la funció de la CFTR a nivell de l'intestí prim, pot explicar la presència de l'ili meconial. (30).

A nivell de les glàndules sudorípares, els mecanismes de transport iònic s'inverteixen. (figura 17a i 17b). Els pacients amb FQ, no reabsorbeixen els ions clorur, donant com a resultat gran quantitat de sal a la suor. Degut al flux disminuït de clorur sòdic.

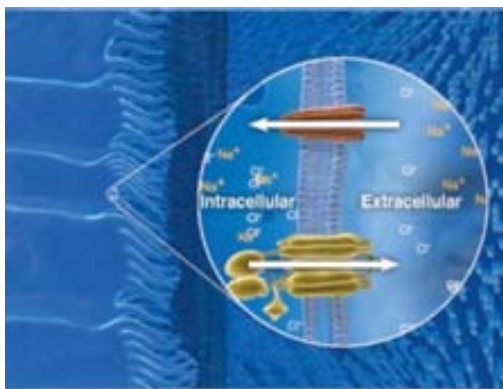


Figura 16a. Cèl·lula epitelial bronquial normal. Observis la secreció de clor i l'absorció de sodi.

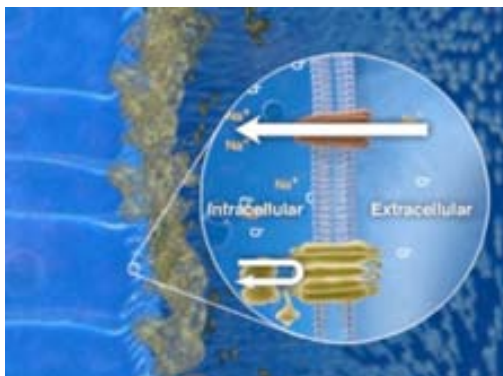


Figura 16b. Cèl·lula epitelial d'un malalt amb FQ. Observis la impermeabilitat del clor i la hiperabsorció del sodi.

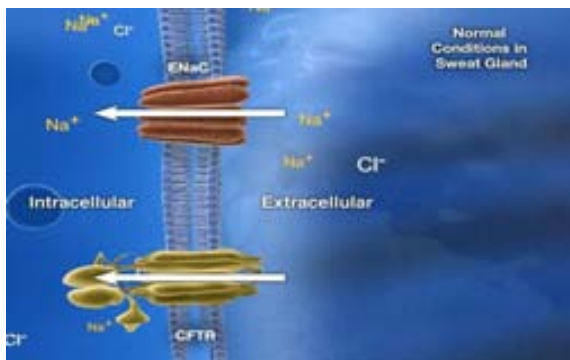


Figura 17a. Glàndula sudorípara d'una persona sana. Observis el flux d'ions clorur cap a l'espai intracel·lular, situació inversa al flux d'ions a la cèl·lula epitelial bronquial.



Figura 17b. Glàndula sudorípara d'un malalt amb FQ. Els ions  $\text{Na}^+$  es queden a l'espai extracel·lular, motiu per el que es deshidraten amb tanta facilitat els malalts amb FQ

#### 1.4.5.3 Alteració iònica resultant: clor, sodi i aigua

Els trastorns del transport iònic en la FQ afecten sobretot als ions sodi, clorur i al bicarbonat. Degut a la impermeabilització del  $\text{Cl}^-$  a la cèl·lula epitelial bronquial i la hiperabsorció de sodi cap a l'interior de la cèl·lula, s'arrossega aigua cap a l'espai intracel·lular la qual cosa comporta que les secrecions respiratòries siguin més espesses. L'alteració iònica dóna com a resultat els trastorns fisiopatològics de la FQ tal com es pot veure a la taula 2.

1.- La membrana apical de la cèl·lula és impermeable al pas dels ions clor
2.- Es produeix un excés d'absorció de sodi
3.- Es produeix una disminució del transport de líquid transepitelial (surten menys aigua cap a del moc de la llum bronquial).
4.- La falta d'aigua a l'espai extracel·lular, produeix un increment de la viscositat de les bronquials amb la conseqüent ineficiència de l'aclariment mucociliar (immunodeficiència en els gèrmens) i mala humificació de l'aire inspirat.

Taula 2. Conseqüències de l'alteració iònica

#### 1.4.5.4 Infecció, colonització bacteriana i biofilm

En el tracte respiratori, degut a l'alteració iònica s'altera la composició hídrica de la capa sol del moc comportant un aclariment mucociliar reduït i una dilatació de les glàndules ductals degut a la inflamació peribronquiolar que afavorirà en primer lloc les infeccions respiratòries desde el període neonatal i en un moment més avançat la colonització crònica per microorganismes (figura 18).



Figura 18. Cultiu per *Pseudomonas aeruginosa*

La majoria d'aquests gèrmens, com per exemple les *Pseudomonas aeruginoses*, la *Burkholderia cepacia*, els *Staphylococcus aureus* i els *Hemophilus influenzae* produeixen infeccions recidivants i colonització, amb lesions irreversibles a la paret bronquial així com la destrucció del teixit pulmonar. La inflamació produïda per la infecció i per la pròpia malaltia condiciona l'adherència molt exagerada del germen a l'epiteli bronquial, gràcies a unes proteïnes que presenten les *Pseudomonas aeruginoses* (adhesines) que s'uneixen a uns receptors cel·lulars de l'epiteli bronquial (aGM1). Això afavoreix l'alliberament de toxines bacterianes per part dels gèrmens sobre tot de les *Pseudomonas aeruginoses* que donarà pas a més inflamació neutrofílica i a la conformació d'una capa d'alginat anomenada biofilm, que recobreix les colònies de gèrmens la qual cosa condiciona que les *Pseudomonas aeruginoses* creixin a més velocitat i més protegides.

Les conseqüències d'aquesta colonització és la inflamació que donarà lloc a una endobronquitis que cursarà amb atelèctasis, fenòmens de reparació bronquial (fibrosi) i atrapament aeri, que finalment produiran bronquièctasis difuses. En les fases avançades de la malaltia broncopulmonar degut al dany pulmonar es produirà una insuficiència respiratòria crònica (hipòxia, hipertensió pulmonar i cor pulmonale crònic).

La disfunció o la absència de funció de la CFTR produeix també obstrucció en altres òrgans, produint l'espectre multisistèmica de la malaltia. Malaltia gastrointestinal, ili meconial, obstrucció del canalicles biliars, inofensiva pancreàtica, absència congènita de conductes deferents i infertilitat masculina.

#### 1.4.5.5 Resum de la fisiopatologia de la Fibrosi Quística

Les conseqüències de l'alteració iònica estant resumides a la taula 2 i a la figura 19.

Aquestes anomalies del transport iònic comporten un trastorn elèctric, és a dir, una diferència entre cargues elèctriques positives i negatives a través de la membrana bronquial, que s'expressa en termes físicoquímics com una diferència de potencial (DP) i es mesura en milivolts (mV). La figura 19 resumeix aquest procés.

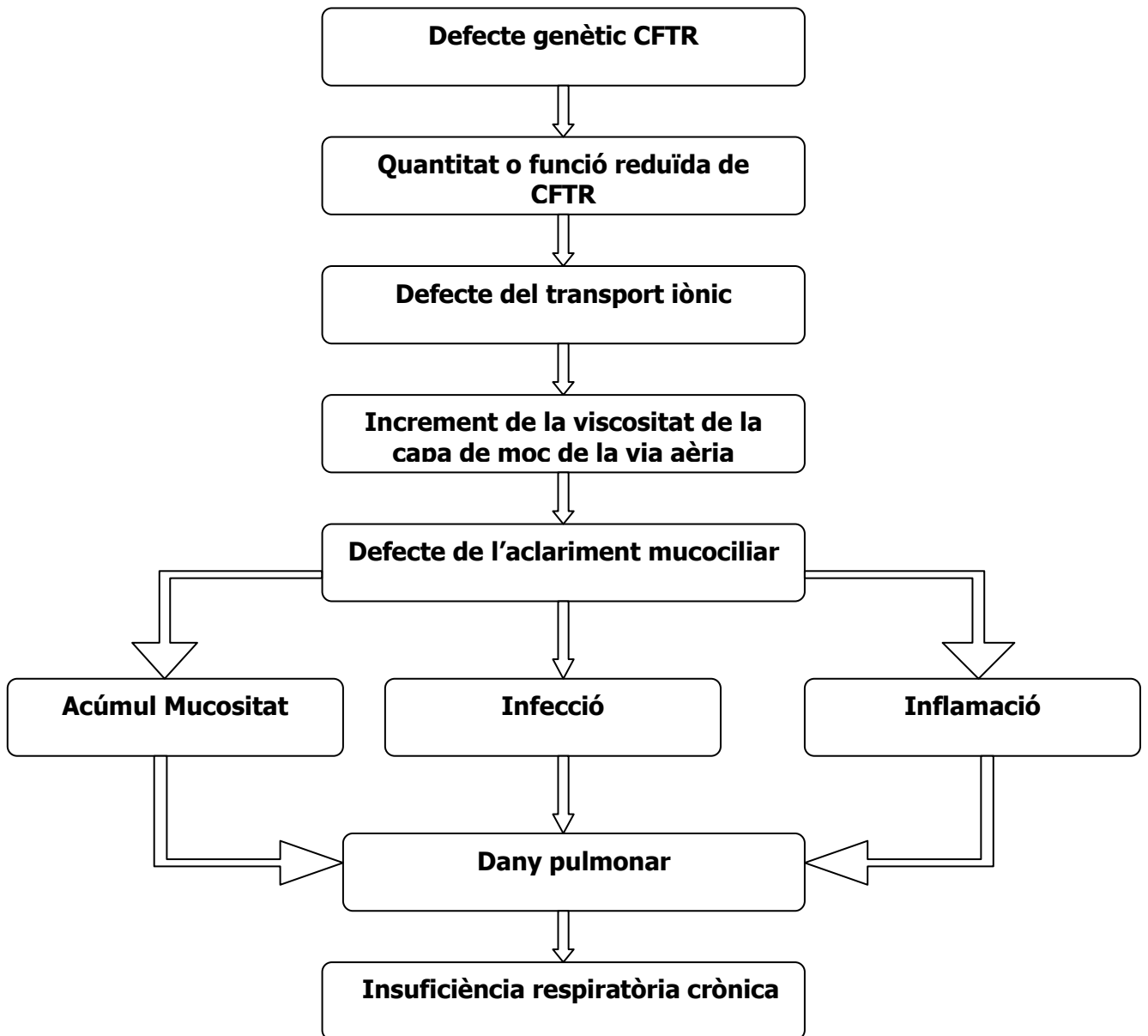


Figura 19. Fisiopatologia de la FQ (31)

## 1.5 Manifestacions Clíniques

### 1.5.1. Pulmonars

La malaltia pulmonar es la que causa major morbi-mortalitat. Els pacients amb FQ presenten inflamació de la via aèria i infecció endobronquial crònica. La fallida de les defenses sumada a l'endobronquitis bacteriana, dona una intensa inflamació neutrofílica que acaba en una obstrucció de la via aèria que junt amb la infecció produeix un dany pulmonar irreversible (31).

Les manifestacions més prematures són: tos crònica, producció d'expectoració purulenta i la dispnea. Quan la malaltia progressa es produeix la endobronquitis crònica, el dany estructural de les vies aèries i fenòmens de reparació pulmonar. Tot això comporta insuficiència respiratòria. (32).

#### 1.5.2. Gastrointestinals

Les manifestacions gastrointestinals suposaven fa anys la causa més important de mortalitat. En l'actualitat el panorama ha canviat gràcies al tractament amb enzims pancreàtics i els suplementes de vitamines liposolubles. Les manifestacions clíniques gastrointestinals més importants són :

- Ili meconial. Té una incidència entre el 15 – 20% dels nadons diagnosticats de FQ i és degut a les obstruccions i dilatacions de l'intestí prim, secundàries a la viscositat de les secrecions d'aquests nens.
- Obstrucció intestinal. Abans s'anomenava equivalents meconial i en anglès DIOS (distal intestinal obstruction syndrome). Son obstruccions parcials o completes de l'intestí, degut a la retenció de les secrecions viscoses i del material fecal a colon distal i cec. Tot i ser més predominants en els adolescents i adults (15 al 20 % dels malalts) poden afectar també als nens (33).
- Insuficiència pancreàtica amb malabsorció. La presenten el 40% dels lactants diagnosticats de FQ per cribratge neonatal. La manifestació clínica de la malabsorció de greixos és l'esteatorrea, el retard pondoestatural i la malabsorció de vitamines liposolubles i de zenc (34).
- Malaltia hepatobiliar. Cursa amb elevació de les transaminases a l'edat escolar però rarament progressa a cirrosi biliar. La malaltia hepàtica en canvi, apareix amb una freqüència del 6.1%, pot progressar cap a la hipertensió portal i varius esofàgiques (35). La malaltia hepàtica és la segona causa de mortalitat després de l'afectació pulmonar.

#### 1.5.3. Endocrinològiques

La manifestació més important és la diabetis secundària a la FQ (36). A l'adolescència (entre 11 i 17 anys) afecta al 7% dels malalts amb FQ. La prevalença va augmentant amb l'edat. La causa de la diabetis es la fibrosi pancreàtica i la infiltració grassa del pàncrees, que comporten la destrucció de l'arquitectura pancreàtica. La destrucció de les cèl·lules beta dels illots de Langerhans productores d'insulina, comporta la reducció una menor producció d'insulina. Apareix però un fenomen de neosidioblastosi o formació de nous illots de cèl·lules pancreàtiques diferents als illots de Langerhans. Això motiva que el comportament clínic dels malalts sigui diferent als diabètics habituals doncs la disminució de la secreció d'insulina per part dels illots pancreàtics malmesos es veu parcialment compensada, de manera que aquests malalts solen necessitar insulina en situacions de stress com ara les infeccions. Els malalts amb FQ però que cursen amb diabetis tenen pitjor pronòstic doncs presenten més deteriorament de la funció pulmonar i pitjor supervivència (37). La cetoacidosi diabètica i les complicacions pròpies de la diabetis són rares en aquests pacients perquè no són obesos i tenen una esperança de vida molt curta (38).



#### 1.5.4. Musculoesquelètiques

El 15 % dels malats amb FQ > 12 anys poden desenvolupar una osteoartropatia hipertròfica. Es presenta en fases avançades de la malaltia i normalment en el context de freqüents i greus exacerbacions pulmonars. L'osteopènia i les fractures són freqüents degut al dèficit nutricional, la falta de calci i vitamina D, la poca activitat física i efectes secundaris de la medicació, especialment dels glucocorticoides.

#### 1.5.5. aparell reproductor

Més del 95% dels homes afectes de FQ són infèrtils. La majoria dels pacients masculins amb FQ tenen una absència congènita bilateral dels conductes deferents. Pot presentar-se formant part d'una afectació generalitzada o multisistèmica o bé de manera monosimptomàtica. L'absència, atròfia o fibrosi dels conductes deferents comporta azoospermia (39). L'epidídim i les vesícules seminals poden ser normals, anormals o estar absents.

Les dones acostumen a ser fèrtils, a excepció d'algunes que tenen el moc cervical molt espès. La majoria de les malaltes de FQ poden però, tenir una gestació completa. Es considera contraindicada la gestació si el FEV<sub>1</sub> és < a 50% i l'estat nutricional és dolent. Les dones amb malaltia lleu o moderada poden tenir un embaràs amb les mateixes complicacions que las de la població general (40).

### 1.6 Diagnòstic

#### 1.6.1. Criteris diagnòstics

EL diagnòstic de la FQ es basa en els criteris de Rosenstein. Els criteris son els següents:

- Presència de les manifestacions clíniques pròpies de la FQ
- més
- Evidència de la disfunció de la CFTR basada en una de les següents característiques:
  - ✓ Prova de la suor quantitativa patològica (concentració de clor > 60 mmol/ml) comprovada al menys en 2 determinacions realitzades en 2 ocasions diferents
  - ✓ Presència de dues mutacions descrites com mutacions CFTR causants de malaltia
  - ✓ Valor de la diferència de potencial nasal (DPN) característica de FQ (41).

El diagnòstic de FQ només es pot realitza en absència de manifestacions clíniques quan s'instauren els programes de cribratge neonatal (veure apartat 1.6.5).

#### 1.6.2. Prova de la suor

La determinació quantitativa d'electròlits en la suor ha estat des de la seva introducció la prova de laboratori més important per confirmar o descartar la sospita clínica de la malaltia. Per a la seva correcta realització i perquè els resultats siguin vàlids s'han de prendre una sèrie de precaucions. El

National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional pels Estàndards del Laboratori Clínic) ha publicat les guies per a realitzar de forma apropiada la prova de la suor (42, 43). Tot el procediment ha d'ésser realitzat pel mateix professional entrenat. Ell es el responsable de l'obtenció i anàlisi de la mostra, el control de qualitat i la interpretació bioquímica dels resultats. Només dos mètodes quantitius son acceptats per la col·lecció de la suor: el de Gibson i Cooke (utilitza un paper secant) i el de conductivitat que utilitza un tub capil·lar de plàstic (dispositiu Macroduct).

En ambdós mètodes, l'estimulació de la sudoració es realitza per iontoforesis amb pilocarpina. Segons aquestes guies, s'ha de utilitzar un mètode que asseguri: a) la recollida de 1gr per metre quadrat de suor per minut durant 30 minuts; b) un pes mínim de suor de 75 mg quan s'utilitza un filtre de paper o un volum mínim de suor de 15 µL, quan s'utilitzen microtubs.

A la pràctica diària del nostre centre s'utilitza el sistema Wescor Macroduct®. Es fa una determinació com a cribratge de la malaltia; si el valor de Cl<sup>-</sup> es > 40 meq/L, es recull la suor i s'analitza en el laboratori de bioquímica. Les figures 20 a 25 mostren la tècnica Macroduct per realitzar la prova de la suor.



Figura 20. Col·locació dels elèctrodes



Figura 21. Col·locació del microtub per per induir la sudoració la recolecció de la suor



Figura 22. Observis el microtub en posició

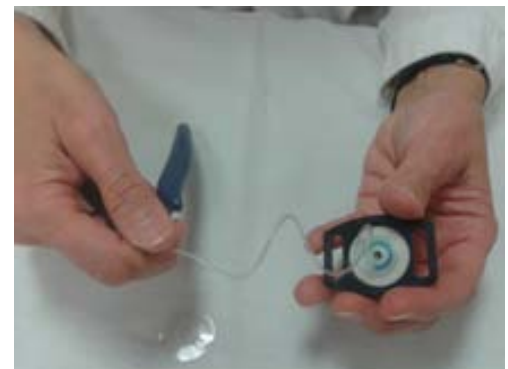


Figura 23. extracció del microtub



Figura 24. Amb una xeringa, s'aspira microtub de lectura



Figura 25. Col·locació del microtub a per omplir el l'aparell de lectura

La prova de la suor és positiva en el 98% dels pacients amb FQ. Una concentració de clor a la suor  $<30$  mEq/L en nadons i de  $<40$  mEq/L en nens i adults es considera negativa. Encara que en la població adulta valors de clor en la suor entre 40–59 mEq/L poden no ser obligatòriament patològics, aquets malats precisen d'una avaluació més acurada .

Les guies actuals pel cribratge neonatal indiquen que valors entre 30–59 mEq/L són valors límit en els nens. Aquests cassos s'han de seguir clínicament i s'han de repetir proves de la suor més tard. Això ve avalat per l'experiència del cribratge neonatal de Wisconsin on s'ha demostrat que tots els pacients amb proves de la suor amb valors superiors a 40mEq/L de clor desenvoluparan durant la lactància una FQ clínica (43, 44).

Poden haver-hi falsos positius i falsos negatius de la prova de la suor. La causa més freqüent de resultats falsament negatius són errors tècnics (realització esporàdica de la prova, personal inexpert, inadequada estimulació , contaminació, evaporació, condensació, transport inadequat, en l'anàlisi d'electròlits). La taula 4 resumeix les causes de falsos positius i negatius (taula 3).

<b>Prova de la suor falsos positius</b>	<b>Prova de la suor: falsos negatius</b>
Fucosidosis	Errors tècnics
Glucogenosis tipus I	Baixa taxa de sudoració
Mucopolisacaridosis	Algunes mutacions amb clorurs en valors "du
Hipotiroïdisme	
Diabetis insípida nefrogènica	
Insuficiència adreNal	
Hipoparatiroidisme familiar	
Èczema	
Desnutrició	
Displàsia ectodèrmica	
Infusió de prostaglandina E 1	
Anorèxia nerviosa	
Disfunció autonòmica	
Dèficit de glucosa 6-fosfatasa deshidrogenasa	
Síndrome de Muriac	
Pseudohipoaldosteronismo	
Colèstasis familiar	

Taula 3. Causes de proves de la suor falsament positives o negatives

### 1.6.3 Prova de la diferència de potencial nasal

El transport iònic de l'epiteli respiratori té un patró bioelèctric característic.

Els índex bioelèctrics han estat validats extensament en teixits humans en fresc i in vitro en cultius de cèl·lules epitelials de la via aèria. L'absència de la funció de la CFTR produeix alteracions en el fluxe de clor i en el transport de sodi, provocant una diferència de potencial elèctric a través de les superfícies epitelials anormal. Aquesta diferència de potencial anormal descrita per primera vegada l'any 1981 per Knowles (45), ofereix una possibilitat diagnòstica que es considera en l'actualitat com un dels criteris diagnòstics de FQ i l'única prova de mesura in vivo capaç de estudiar la funció de la CFTR.

Les mesures de diferència de potencial transepitelial (DP) es poden realitzar tant al nas com a les vies respiratòries inferiors o al tub digestiu. La localització més fàcil per fer la prova és la mucosa nasal. Es mesuren els valors de la diferència de potencial en l'epiteli nasal.

La diferència de potencial nasal (DPN) es una tècnica considerada "Tècnic-dependent" ja que s'ha demostrat una important variabilitat entre laboratoris. La falta d'estandardització podria comprometre la utilització d'aquest mètode com a prova diagnòstica per la FQ. Per totes aquestes raons un grup d'investigadors americans van publicar una completa descripció del protocol estandarditzat i una avaluació de la seguretat per a mesurar la DPN en pacients amb edats superiors a 6 anys (46, 47).

Destaquen uns punts que són de necessari compliment quan es vol determinar la mesura de la diferència de potencial nasal:

- El catèter de mesura subcutani ha de ser estandarditzat
- El catèter nasal també ha de ser estandarditzat, podent ser de calomel o de clorur de plata.
- El contacte del catèter amb la mucosa nasal es pot fer mitjançant l'ús d'una solució d'agar o amb una perfusió continua de sèrum fisiològic.
- S'ha d'assegurar el lloc d'inserció del catèter en el nas (figura 26 a i b)
- Per fer correctament tota la prova s'ha d'irrigar la mucosa nasal amb diferents solucions escalfades a una temperatura de 35-37°C
- La metodologia per escalfar les solucions es basa en la preferència del centre, essent freqüent l'ús el "bany Maria".

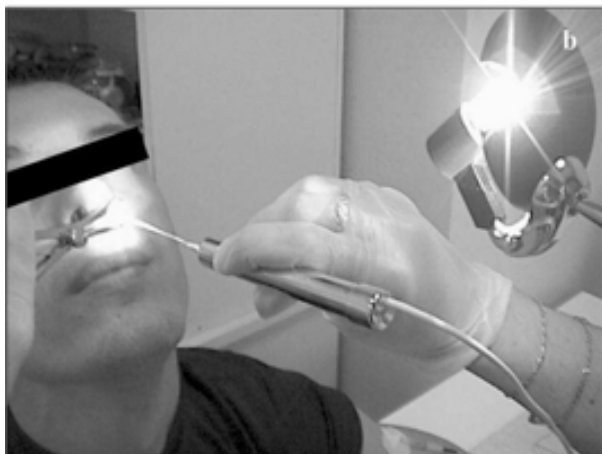
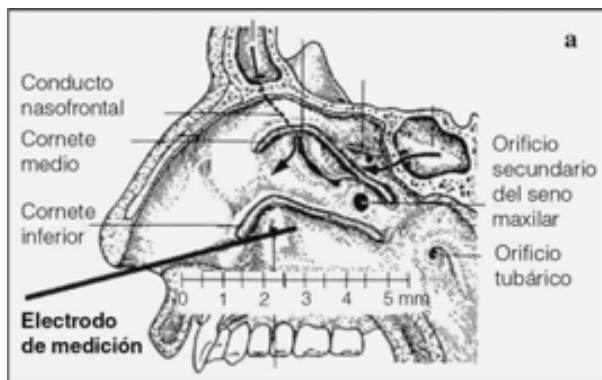


Figura 26 a i b. Visualització nasal per poder buscar el lloc adient d'inserció del catèter. a) Esquema. b) pacient real

Interpretació general dels valors de DPN en malalts amb FQ (taula 4 i Figura 27).

- En individus sans els valors es situen al voltant de  $-20$  mV i en els malalts afectes de FQ són  $>$  en valor absolut (més negatius). Habitualment els valors de DPN en malalts amb FQ son de  $\leq -45$  mV .

- Després de la perfusió amb amilorida (inhibidor dels canals de Na<sup>+</sup>) els malalts amb FQ presenten valors de DPN > valors basals (més positius). Això també passa en persones sanes però en els malalts amb FQ aquest increment es més ostensible. L'amilorida bloqueja per inhibició competitiva la reabsorció de Na<sup>+</sup> de manera reversible. Al quedar més Na<sup>+</sup> a la llum bronquial, la DPN és més positiva (menys negativa, s'acosta més a zero).
- Els β-bloquejants afavoreixen la sortida de clor a la llum bronquial ja que activa l'obertura del canal de clor. La perfusió de la mucosa amb isoproterenol (β-bloquejant) en una persona sana, després de la irrigació amb solució lliure de clor i amilorida, farà que la DPN sigui més negativa que el valor post irrigació amb amilorida. En els pacients amb FQ degut a l'absència o disfunció del canal de clor, els simpaticomimètics β-2 no poden produir l'obertura dels canals de clor via activació de l'adenilciclasa i l'AMPc com succeeix en els subjectes sans. Aquesta prova, la irrigació amb isoproterenol, és la més específica i sensible per poder diagnosticar una disfunció de la CFTR. Publicacions recents han demostrat que mutacions genètiques en altres locus diferents del CFTR, poden produir manifestacions clíniques semblants a la FQ i canvis semblants de la DPN després de l'amilorida (48) però no després de la irrigació amb Isoproterenol. Perlotant aquets pacients no son FQ.

Resum dels canvis de la DPN després de la irrigació amb diferents substàncies.

	<b>Basal</b>	<b>Amilorida</b>	<b>Amil+Solució clor</b>	<b>Amil+Solució lliure de bloquejant</b>
<b>Individu Normal</b>	> -45 Menys negatiu	>> -45 Positivació (s'acosta al zero)	Negativitza però menys negatiu que basal	Negativitza més que amb Solució lliure de clor, acostant-se al valor basal
<b>Malalt amb FQ</b>	< -45 Més negatiu	>>>> -45 Positivació (s'acosta al zero) (canvi > al normal)	No varia o canvia mínimament	No varia o canvia mínimament

Taula 4 . Interpretació dels valors de la mesura de la DPN

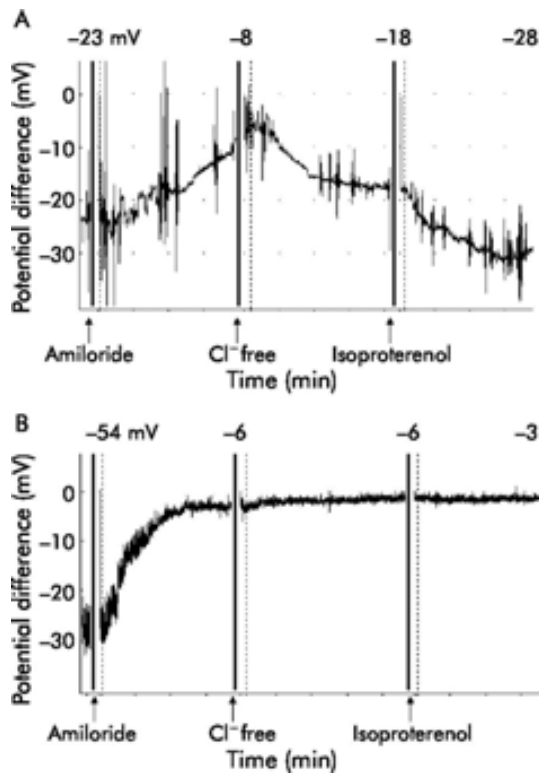


Figura 27. Gràfica de la determinació de la DPN; A: control sa. Observis com després de la irrigació amb amilorida, es positivitza el valor de DPN, però que la irrigació amb isoproterenol la torna a negativitzar. B: pacient amb FQ. En aquest cas, després de la irrigació amb amilorida, es positivitza el valor de DPN, però la irrigació amb isoproterenol pràcticament no varia el valor de DPN. Extret de Knowles MR, Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. Am Rev Respir Dis. 1981;124 :484-90.

S'han publicat uns articles que demostren que els pacients fumadors poden tenir alterat la DPN en igual que els pacients amb FQ. Això obliga a determinar l'estat de fumador abans d'interpretar una mesura de la DPN (figura 28) (49).

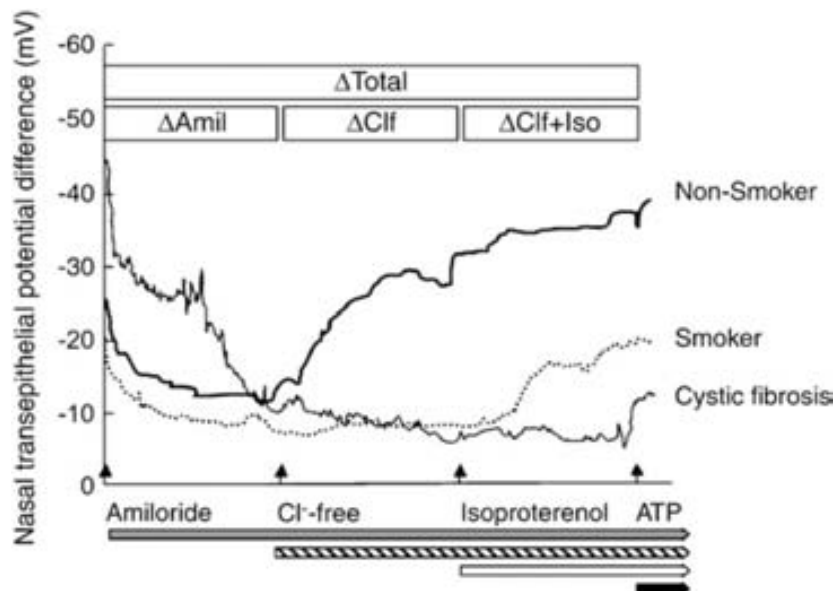


Figura 28. Gràfica de la determinació de la DPN. Observis que el tabac redueix la funció CFTR. Reproduït de Sloane PA i col.laboradors. PLoS One. 2012; 7:e39809.

#### 1.6.4 Diagnòstic molecular

El gen que regula la CFTR és l'únic gen que s'associa a la FQ. La detecció dels dos al·lells mutats en el gen *CFTR* confirma el diagnòstic de FQ. La confirmació del diagnòstic de FQ basada en la presència de dues mutacions en el gen *CFTR* és altament específica però no molt sensible a causa del gran nombre d'al·lells possibles.

Les proves genètiques moleculars de la *CFTR* són útils per (50):

- Diagnòstic d'individus sospitosos
- Identificació de portadors
- Estudi de parelles de portadors especialment en època reproductiva
- Diagnòstic genètic prenatal
- Per categoritzar la gravetat dels pacients
- Per dissenyar futures estratègies terapèutiques

Des d'un punt de vista pràctic es comença l'estudi genètic amb una varietat de panells capaços de detectar les mutacions més freqüents de la *CFTR*. Són panells que porten de 23 a 50 mutacions (figura 29), dissenyats segons l'experiència de l'investigador, la zona geogràfica o la raça. En cas d'haver-hi dues mutacions en dos al·lells no cal prosseguir l'estudi i s'accepta el diagnòstic de FQ.

CFTRdele2,3, E60X, P67L, G85E, 394delTT, 621+1G>T, Y122X, R117C, R117H, 444delA, 711+1G>T, L206W, 1078delT, R334W, R347H, R347P, A455E, V520F, 1677delTA, I507del, F508del, 1717-1G>A, G542X, S549R(T>G), S549N, G551D, R553X, R560T, 1811+1.6kbA>G, 1898+1G>A, 2143delT, 2184delA, 2347delG, W846X, 2789+5G>A, Q890X, 3120+1G>A, 3272-26A>G, R1066C, Y1092X(C>A), M1101K, D1152H, R1158X, R1162X, 3659delC, S1251N, 3849+10KbC>T, 3905insT, W1282X, N1303K, Intron 8 polyT (5T/7T/9T) y TGn  
**Nivel de detección en la población FQ española 81%**

Figura 29. Panell de les 50 mutacions que es realitzen de cribratge

En casos de portadors (quan el malalt té una sola mutació, o s'han trobat dues mutacions i es vol descartar que les dues mutacions estiguin en el mateix al·lel) s'ha d'estudiar el gen complet que es fa a quatre nivells. En primer lloc es fa un anàlisi de les regions codificants del gen de la CFTR i annexos. Aquest anàlisi es realitza mitjançant les tècniques de seqüenciació DGGE i SSCA, que tenen un nivell de detecció de mutacions del 93%. El següent pas es dur a terme l'estudi dels marcadors intragènics de la timidina (IVS8-6 (T), IVS8CA, 154A/Gi i IVS17bTA) localitzada en el intró 8 del gen *CFTR*. En tercer lloc s'ha d'estudiar l'al·lel polivariant TG situat en el mateix intró 8 donat que la variant TG12 s'associa també a una producció disminuïda de CFTR. Finalment, s'ha de descartar la presència del polimorfisme M470V, en el que s'ha substituït la metionina 470 per la valina; s'ha observat que aquest polimorfisme s'associa també a una disminució de les propietats conductores de clor de la CFTR madura.



Les 3 variants més freqüents de timidines són: 5T, 7T i 9T anomenades així segons el nombre de timidines que contenen. Un menor nombre de timidines a l'intró 8, dona com a resultat un processament del ARNm ("splicing") més deficitari i com a conseqüència un dèficit de transcripció de *CFTR*. Els pacients portadors de l'al·lel 5T tenen per tant una alteració de la funció *CFTR* més greu que els portadors dels al·lells 7T o 9T. Des del punt de vista clínic, aquestes variants poden causar un dèficit de funció de la *CFTR* similar a les mutacions moderades de *CFTR*. Els portadors de l'al·lel 5T es consideren pràcticament com a portadors d'una mutació amb penetració variable. Les variants 7T i 9T es consideren polimorfismes A més l'expressió dels al·lel intragènic de les timidines pot variar en funció de si està en posició trans o en cis.

Existeix una peculiaritat en la interpretacions de la mutació R117H. Per si sola, no està contemplada com una mutació que afecti la funció de la *CFTR* i per tant l'individu no es considera FQ. Però quan aquesta mutació s'associa a la variant 5T o 7T en la configuració CIS, sempre i quan el malalt tingui un altre mutació característica de FQ, podria desenvolupar malaltia pulmonar típica de FQ. Els pacients amb la variant 7T en posició CIS, amb una mutació R117 H i un altre mutació *CFTR* poden presentar una gran varietat fenotípica oscil·lant des de la possibilitat d'estar asimptomàtics fins a presentar malaltia pulmonar moderada (51).

#### 1.6.5 Diagnòstic d' insuficiència pancreàtica (IP)

Les proves més significatives pel diagnòstic són les proves de malabsorció. Són proves que serveixen per a demostrar la pèrdua de greixos per la matèria fecal. Les proves són les següents:

- Observació de les característiques de la matèria fecal. S'ha de valorar l'olor, color, consistència, quantitat, presència de greix (referida pels pares com a presència de "gotes d'oli" a la femta).
- Microscòpia òptica. Serveix per detectar greix en preparats de matèria fecal. És poc específica i la seva negativitat, no descarta malabsorció. També hi ha casos de falsos positius en altres entitats que cursen amb pèrdua de greix en matèria fecal.
- Prova de Sobel. És un mètode quantitatiu que consisteix en la determinació d'àcids grassos en la quantitat total de matèria fecal recollida durant 3 dies, sense sobrecàrrega de greix oral, però assegurant una dieta normal per a l'edat. Es precisa un aportació de 35-40% de calories en forma de lípids o un equivalent no  $\geq 2$  g/kg/dia de greixos. Les mostres han de ser processades individualment. El percentatge d'absorció de greix és un índex més fiable que el valor absolut d'excreció però exigeix un coneixement real de la quantitat de lípids ingerits. Normalment, l'excreció fecal de greixos és  $< 7\%$  de la ingesta. El coeficient d'absorció de greixos es pot calcular de la següent manera:  $(\text{greix ingerit} - \text{greix eliminat}) / \text{greix ingerit}$ , essent normal un valor  $> 93\%$ . A la pràctica diària, és difícil en molts casos realitzar aquest càlculs de manera fiable de manera que habitualment el que es fa es mesurar els valors absoluts de greix en femta. Es consideren normals valors  $< 2,5$  g/dia de greix en nens i  $< 5$  g/dia en adults.
- Elastasa pancreàtica en matèria fecal. L'elastasa és una proteasa específica sintetitzada per les cèl·lules acinars del pàncrees que no s'altera durant el trànsit intestinal. A les dues setmanes els seus valors en femta són similars al dels adults, de manera que es una dada fiable pel diagnòstic

d'insuficiència pancreàtica. La seva concentració en matèria fecal és 5 a 6 vegades > que en el líquid pancreàtic. La determinació es fa amb el mètode de enzimoimmunoassaig (ELISA) i no és necessari suspendre el tractament enzimàtic. El valor normal és > 200 µg/g de femta. (52).

#### 1.6.6 Cribratge neonatal i diagnòstic prenatal

##### 1.6.6.1 Cribratge neonatal

El primer país en el que es va realitzar va ser els EEUU seguit d'Israel i d' Austràlia (53,54). A Catalunya es va implementar l'any 1999.

El protocol de cribratge neonatal consensuat a Catalunya és realitza per despistar un nombre de diverses malalties entre les quals es troba la FQ.

En l'apartat següent descrivim el cribratge neonatal per la FQ tal com es fa a Catalunya (55):

- Determinació de la tripsina immunorreactiva (TIR) en sang de taló a l'Institut Bioquímic de l'Hospital Clínic de Barcelona. Si el valor de TIR es > 120 ng/ml es passa al pas següent.
- Es fa una segona determinació de la TIR, també amb sang de taló. Si es > 60 ng/ml es passa a efectuar l'estudi genètic mitjançant un panell que inclou les 50 mutacions més freqüents a Catalunya (figura 29)
- Tant si surt alguna mutació com si no, el lactant que per cribratge ha presentat 2 valors de TIR elevats és enviat al centre de referència de FQ que li pertoca per zona per realitzar 2 proves de la suor.

Les dades s'interpreten de la següent manera:

- Si les proves de la suor són negatives i l'estudi genètic és negatiu es descarta el diagnòstic de FQ i es dona d'alta el malalt.
- Si les proves de la suor són positives o existeixen 2 mutacions, es considera l'individu malalt de FQ.
- Si les proves de la suor són negatives i el lactant és portador d'una mutació genètica (portador) es passa a estudiar el gen extensivament.
- Si les proves de la suor són positives i no hi han mutacions, s'estudia el gen extensivament.

##### 1.6.6.2 Diagnòstic prenatal:

El diagnòstic prenatal està indicat en els embarassos amb risc de poder transmetre alteracions genètiques de la CFTR sempre i quan les mutacions de la família siguin conegudes.

Les actuacions a seguir segons la legalitat vigent a Catalunya són:

- Embarassos d'alt risc (pare i mare portadors d'una mutació o tinguin la malaltia). Es pot realitzar una biòpsia de les vellositats coríntiques a les 10-12 setmanes de gestació per realitzar un estudi genètic molecular orientat a estudiar a l'estudi de les mutacions dels pares.
- Embarassos amb risc indeterminat (pare portador, mare negativa o a la inversa). No s'aconsella realitzar estudi prenatal doncs no es coneixen les possibles mutacions dels progenitors. En cas de molta angoixa familiar, es poden determinar els enzims pancreàtics a líquid amniòtic. Si son molt elevats, existeix la possibilitat de que el fetus sigui un malalt de FQ tot i que no es pot assegurar en cap cas. L'actitud posterior dependrà de l'opinió de la família.
- Embarassos de baix risc. Si es desconeix el genoma dels pares però hi ha troballes en l'ecografia prenatal suggestives de FQ (intestí ecogènic) es pot realitzar estudi genètic als pares i una biòpsia coriònica al fetus (56).

### **1.7 Formes Clínicas de la Fibrosi Quística**

Les característiques clíniques de malaltia clàssica de la FQ (malaltia sinopulmonar, insuficiència pancreàtica, infertilitat masculina i prova de la suor elevada) són ben conegudes per la majoria del pediatres i metges d'adults. Si la presentació de la malaltia no es clàssica, al pediatre general li és difícil fer la sospita diagnòstica. La gran majoria de malalts afectats de FQ presenten un fenotip clàssic de la malaltia. Es reconeix a la literatura publicada fins ara que més del 85% dels pacients amb FQ presenten insuficiència pancreàtica i aproximadament el 98% proves de la suor elevades.

Però cada vegada és més freqüent trobar formes "atípiques" en que la manifestació clínica pot ser monosimptomàtica i que s'acostumen a diagnosticar a l'adolescència, edat adulta o per cribatge neonatal. En aquests cassos, el diagnòstic clínic de sospita normalment no es pot confirmar amb la prova de la suor perquè acostuma a ser normal o tenir valors intermedis. S'ha de confirmar el diagnòstic de FQ per la presència de 2 mutacions genètiques i/o per una prova "In Vivo" que demostrï la disfunció de la CFTR. Aquests mètodes diagnòstics son molt més complexes i difícils de dur a terme a la pràctica per a la majoria de professionals no especialitzats (57). La literatura descriu casos de FQ amb variants clíniques en les que la sola manifestació clínica pot ser la pancreatitis o la infertilitat masculina sense poder demostrar mutacions en el gen (58).

Per augmentar la confusió, hi ha cada vegada més evidència científica d'associacions de mutacions FQ amb altres malalties com l'aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica, sinusitis crònica i bronquièctasis idiopàtiques (59).

En definitiva doncs els fenotips clínics de la FQ, sobre tot els respiratoris, es poden modificar no solament per la quantitat de proteïna codificada (figura 30) (gradient CFTR) si no també pels factors ambientals i els anomenats gens modificadors que no tenen cap relació amb la CFTR (60).

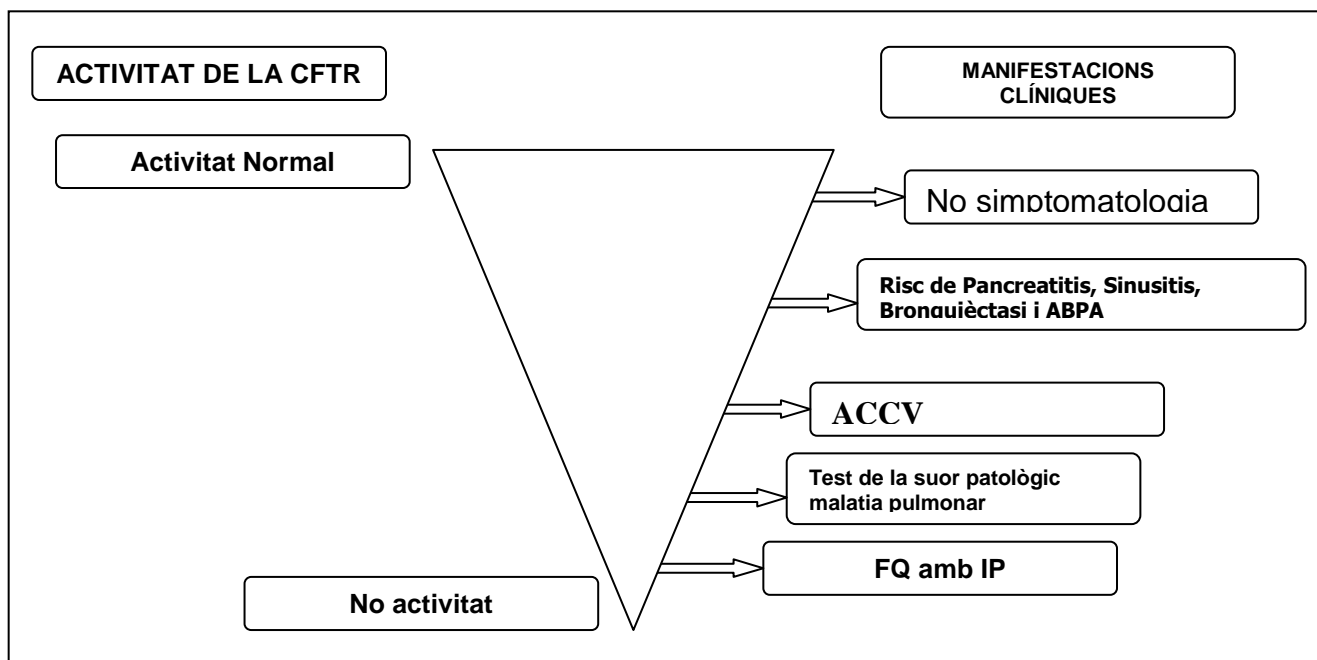


Figura 30. Relació entre la funció de la CFTR i les manifestacions clíniques (61).

Avui en dia, doncs, es diferencien tres grups de malalties degudes a la disfunció de la CFTR

- FQ clàssica o típica
- FQ no clàssica o atípica
- Malaltia relacionada amb la CFTR (entitat clínica associada amb la disfunció de la CFTR que no compleix tots els criteris diagnòstics de FQ)

#### 1.7.1. Forma clàssica

El document de Consens del diagnòstic de FQ descriu com a Forma clàssica de FQ la presència d'una o més manifestacions fenotípiques característiques més 2 proves de la suor patològiques. La insuficiència pancreàtica no és un criteri diagnòstic (52).

#### 1.7.2 Formes no clàssiques

La introducció del concepte de gradient de disfunció de la CFTR és de gran rellevància i serà de gran ajut quan s'ha de considerar el diagnòstic de FQ en malalts amb fenotips moderats, formes no clàssiques de la malaltia o malalties relacionades amb la disfunció de la CFTR.

Si es pot demostrar aquest gradient de disfunció, es podria etiquetar aquestes formes atípiques com FQ no clàssiques o malalties relacionades amb la CFTR. Aquestes formes constitueixen el grup de malalts que proporciona un repte més important als professionals encarregats de la cura dels pacients amb FQ. Actualment, el document de Consens (62) descriu aquest grup de pacients com els que presenten clínica al menys en un sistema i tenen proves de la suor normals ( $Cl^- < 40$  mmol/l o entre 40-60 mmol/l). Actualment es creu que representen el 2% de la població de malalts amb FQ, però aquest valor pot ser infraestimat ja que la verdadera prevalença és desconeguda doncs les formes atípiques

poden passar desapercibudes o ser diagnosticades com altres entitats diferents a la FQ. Aquests malalts solen tenir un fenotip lleu caracteritzat per suficiència pancreàtica exocrina, malaltia pulmonar lleu i fertilitat masculina.

Aquesta CFTR que funciona parcialment pot ser explicada des del punt de vista genètic de tres maneres diferents: a) la presència de dues mutacions de classes moderades; b) la detecció d'una mutació greu i una lleu; c) la detecció d'una mutació (greu o lleu) acompanyada d'un polimorfisme 5T. Com des del punt de vista genètic el diagnòstic pot no ser evident degut a la gran quantitat de mutacions (més de 1900) es precisa d'una prova que avaluï la funció de la CFTR. Una de les proves que mesura la funció de la CFTR es la mesura de la diferència de potencial nasal (DPN). Les formes no-clàssiques de FQ, acceptades actualment pels diferents consensos diagnòstics son dues:

a.- L'absència congènita bilateral dels conductes deferents (ACCD). La presenten aproximadament del 1 al 2% del casos d' homes infèrtils. La literatura senyala que el 50% dels pacients amb ACCD són portadors de 2 mutacions de FQ, essent normalment una de les mutacions moderada de Classe IV o V ( 63).

b.- La pancreatitis idiopàtica recurrent. És la segona anomalia clínica monosimptomàtica que pot ser etiquetada de FQ no clàssica (64). L'any 1998, dos articles publicats per Cohn i Sharer (65, 66) que pràcticament es publiquen al mateix temps, van demostrar la relació entre les mutacions *CFTR* i la pancreatitis recurrent. Aquests articles assenyalen que del 10 al 20 % dels pacients amb pancreatitis recurrent són portadors de 2 mutacions *CFTR*, una d'elles moderada. En la majoria dels casos, la pancreatitis és l'única manifestació clínica de FQ. La majoria de malalts amb FQ i pancreatitis recurrent presenten proves de la suor en el límit i una DPN alterat.

### 1.7 .3. Malalties relacionades amb la disfunció de la CFTR

Clàssicament es descriuen tres entitats: l'aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica, la rinosinusitis crònica i les bronquièctasis difuses.

#### 1.7.3.1. Aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica (ABPA)

Entre el 5 al 10%, dels pacients amb FQ tenen risc de patir una aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica durant la seva vida. Es va publicar per primer cop a l'any 1996, l'associació entre ABPA i mutacions *CFTR* en pacients que no complien criteris clínics de FQ. Seguidament van aparèixer una gran quantitat de publicacions en aquest sentit. Els consens actual de diagnòstic de FQ, exigeix que per etiquetar una ABPA de FQ ha de complir al menys 1 criteri clínic de FQ i 1 criteri de disfunció de CFTR (mesura anòmala de DPN o prova de la suor alterada) o 2 mutacions característiques de FQ (67).

#### 1.7.3.2 . Rinosinusitis crònica

Pràcticament la totalitat dels malalts amb FQ presenten rinosinusitis crònica. Però el diagnòstic de FQ en malalts que només presenten rinosinusitis com a forma monosimptomàtica és controvertit. La majoria de les publicacions han documentat uns valors poc significatius de mutacions de la *CFTR* en els malalts amb rinosinusitis monosimptomàtica comparada amb la població normal. Un estudi publica 58

nens amb sinusitis crònica, 7 dels 58 nens (12%) eren portadors de 1 mutació CFTR, dada de portador menys freqüent que l'esperada a la població general (25%). La poca freqüència de presentació de mutacions en els estudis fa desestimar la FQ com a causa de la fisiopatologia de la sinusitis crònica (68).

Darrerament però, s'han publicat mutacions de la CFTR en el 7% dels pacients afectes de sinusitis crònica sense cap més alteració clínica compatible amb FQ. Alguns d'aquests cassos poden ser eventualment considerats com formes menors de FQ, però per el diagnòstic es necessitaria la determinació de la DPN.

### 1.7.3.3. Bronquièctasis difuses (BD)

Les bronquièctasis difuses idiopàtiques (BDI) es defineixen com a una dilatació irreversible del subsegment proximal del bronqui en el que un cop realitzat el diagnòstic diferencial etiològic (figura 31) no s'ha arribat a cap diagnòstic.

Els factors causals identifiquen aproximadament el 50 % dels casos de bronquièctasis difuses, essent les causes mes comunes les immunodeficiències, infeccions respiratòries en l'edat pediàtrica, l'aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica, la discinesia ciliar primària, la inhalació de irritants, connectivopaties, colitis ulcerosa i dèficit de  $\alpha$ -1-antitripsina.

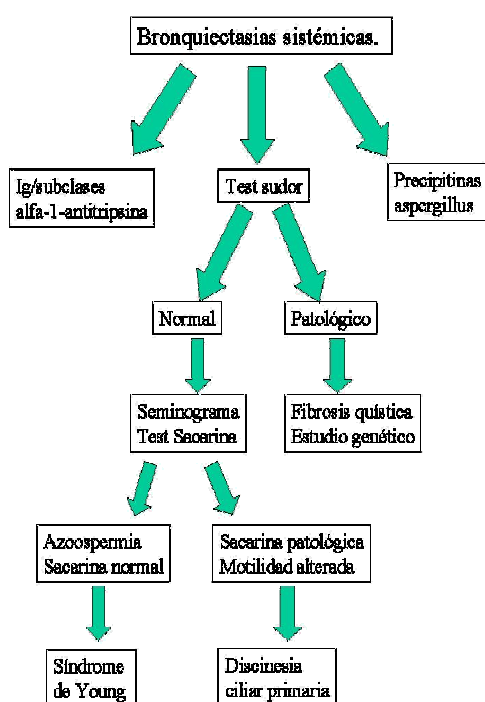


Figura 31. Protocol diagnòstic etiològic de les bronquièctasis difuses.

Davant del diagnòstic clínic de bronquièctasis difuses idiopàtiques, s'hauria de pensar en la possibilitat de formes no clàssiques de FQ. La guia de diagnòstic i maneig de les bronquièctasis de la British Thoracic Society (69) recomana investigar el diagnòstic de FQ en les bronquièctasis que compleixen els següents criteris:

- Causa primària d'infertilitat masculina
- Bronquièctasis difuses
- Història d'esteatorrea a la infància
- Espot positiu de forma permanent a *Staphilococ Aureus*

- Alguna característica de malabsorció intestinal

Les proves recomanades per la guia britànica són:

- 2 proves de la suor
- Anàlisi de les mutacions CFTR
- Determinació de la mesura de diferència de potencial nasal (PDN)

Diversos investigadors han suggerit que les bronquièctasis difuses idiopàtiques (BDI) s'associen amb molta freqüència amb disfunció de la CFTR. Poden inclús ser considerades com formes atípiques de FQ. En un estudi en 32 pacients amb BDI el 20% dels casos presentaven mutacions de la *CFTR* (70-74). En una altra publicació molt similar realitzada en una sèrie de 23 pacients amb BDI, el 30% presentaven mutacions de la *CFTR* i un 26% eren portadors d'al·lel 5T (72). Altres estudis fets amb un número menor de casos i sense cribratge complet de la CFTR presenten resultats diferents. Bombieri y cols (71) conclouen per primera vegada que les mutacions de la *CFTR* en malalts amb BDI poden ser la causa etiopatogènica d'aquestes bronquièctasis. Bombieri y cols però, no van realitzar la determinació de la DPN en els seus malalts sinó que arriben a aquestes conclusions a partir de criteris clínics i microbiològics.

La última Conferència de Consens de diagnòstic de FQ afirma que (62):

- En casos amb BDI sembla lògic acceptar el diagnòstic de FQ, sempre que es demostrï una deficiència de la CFTR.
- En casos sense cap manifestació clínica, tot i que la prova de la suor sigui patològica, la DPN elevada o hi hagi mutacions de la CFTR, de moment, no es pot establir el diagnòstic de FQ. Per aquests casos s'ha proposat el concepte de "Prefibrosi Quística".

S'afegeix per tan un altre possibilitat diagnòstica com a forma no clàssica de FQ: les BDI.

## **1.8 Diferència de potencial nasal (DPN)**

El coneixement de la disfunció de la proteïna CFTR va motivar la recerca d'un nou mètode pel diagnòstic de FQ més sensible i específic, que fos capaç de demostrar "in vivo" l'anomalia fisiopatològica fundamental de la FQ: la prova de la DPN. La mesura de la DPN es una de les dues proves "in vivo" capaces de mesurar la activitat de la CFTR i la disfunció del canal de clor característiques de la FQ (62). Això va motivar canvis en els criteris diagnòstics de la FQ recollits per primera vegada en el consens de 1998 (41).

### **1.8.1 Breu història de la tècnica**

A l'any 1981, el grup de treball dirigit per Knowles (42) va desenvolupar un nou procediment per diagnosticar la FQ, la mesura de la diferència de potencial transepitelial mitjançant un voltímetre, aparell que expressa en mV la diferència de potencial entre dos punts. La DPN, com el seu nom indica, es una mesura realitzada al nas. Els treballs del grup de recerca dirigits per Knowles han demostrat que a la pràctica, les mesures de la DPN obtingudes a l'epiteli ciliat de la regió respiratòria de la mucosa

nasal son superposables a les mesures obtingudes a la mucosa bronquial. La mesura nasal té el gran avantatge de ser de més fàcil accés. Knowles i cols van ser els primers en comprovar canvis en els valors de la DPN després de la irrigació de la mucosa amb substàncies com l'amilorida. Pel registre de les DPN s'han utilitzat diferents dispositius de mesura. El primer dispositiu introduït va ser anomenat "dispositiu de Knowles". Es tracta d'aparells molt grans i no transportables que només es podien utilitzar en un laboratori de recerca. L'any 1998, el grup que dirigia Lindemann a Alemanya va desenvolupar un dispositiu portàtil i simplificat anomenat "Tholy" (figura 32 ), el va validar i va protocolitzar la mesura de la DPN tant basal com després de la irrigació de la mucosa nasal amb diverses solucions (75, 76).



Figura 32 . Tholy: voltímetre de mesura de la DPN dissenyat per Lindemann.

En els últims anys s'ha anat modificant i perfeccionant la tècnica de mesura de la DPN. Els esforços s'han centrat sobretot en l'estandardització i protocolització de la metodologia (77, 78). La variabilitat de la prova es centra sobretot en el desplaçament de l'elèctrode nasal. L'objectiu es mantenir el contacte nasal amb l'elèctrode de forma continua fins i tot durant la irrigació de la mucosa amb les diferents solucions. L'any 2003 es va publicar un article de consens que recomana la mesura del DPN escalfant els líquids d'irrigació de la mucosa nasal a 37 °C (79). Al 2007 es publica un article en el que es demostra la reproductibilitat de la tècnica (80). Més recentment s'han desenvolupat altres dispositius més sofisticats que porten incorporats un software amb un programa informàtic específic per gravar i guardar els resultats de les mesures de la DPN.

### 1.8.2 Concepte fisiopatològic que avalua

La DPN avalua el defecte bàsic de la FQ que resulta d' un transport anormal del Na<sup>+</sup> i del Cl<sup>-</sup> a través de les superfícies epitelials de la via aèria, intestí i glàndules sudorípares. Es produeix un defecte de la secreció de clor (Cl<sup>-</sup>) fisiològicament regulat per la AMPc i un augment de l'absorció basal de sodi



(Na<sup>+</sup>). La DPN mesura la diferència bioelèctrica transepitelial. Aquesta diferència de potencial elèctric es mesura en milivolts (mV) i en relació a la submucosa dona valors negatius. Es pot millorar la rendibilitat de la prova irrigant la mucosa nasal amb diferents solucions

La DPN quantifica de manera directa in vivo les alteracions fisiopatològiques de la malaltia.

Els valors de les mitjanes basals oscil·len entre  $-22 \pm 7.3$  mV en els controls sans i  $-45 \pm 11.4$  en els malalts FQ. La figura 33 mostra els valors mitjans trobats per Hofmann y cols per cada solució en malalts amb FQ (81) .

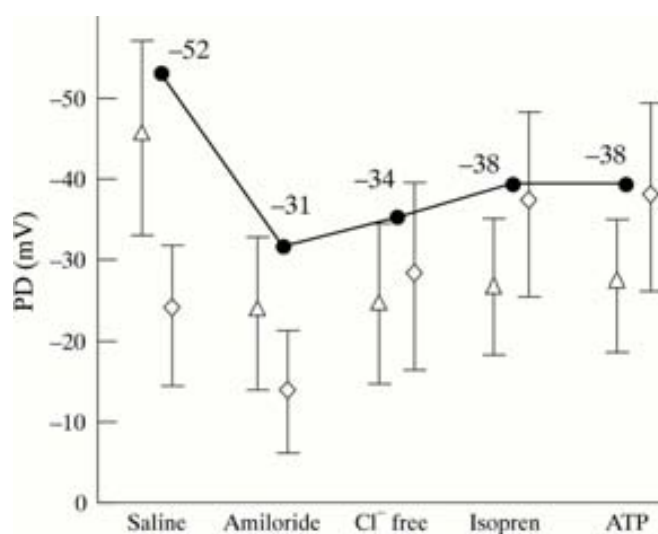


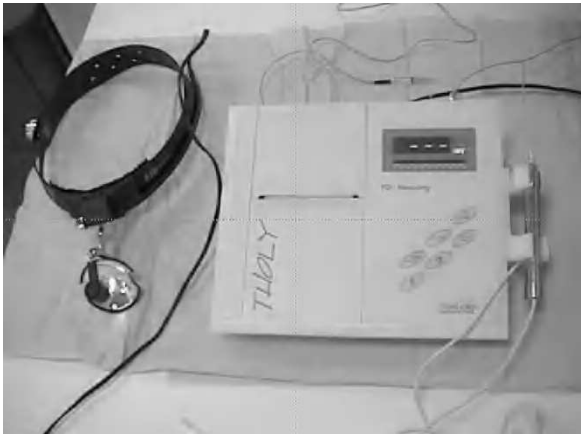
Figura 33. Corba dels valors de PDN en un malalt FQ. Reproduït de Hofmann cita 81

Aquest procediment adquireix una importància especial per diagnosticar els casos de FQ atípics o monossimptomàtics o per monitoritzar les noves teràpies, tant les potenciadores de la CFTR com las gèniques.

### 1.8.3. Descripció genèrica de la tècnica

#### 1.8.3.1. Dispositiu

Per realitzar correctament la tècnica es precisa d'un voltímetre d'alta impedància degudament validat. El dispositiu que hem utilitzat es el Tholy-Medicap® (Ulrichstein, Germany). És un aparell compacte i portàtil que només precisa d'una presa de corrent elèctrica. A més del voltímetre, l'aparell porta un registrador controlat per un microprocessador que disposa d'una memòria integrada dels valors mesurats i una impressora tèrmica per la documentació dels valors. Tot això està connectat a un llapis per el registre de l'elèctrode de mesura i a un cable de connexió per connectar l'elèctrode de referència (Figura 34).



Aquest voltímetre d'alta impedància precisa d'un elèctrode de mesura per la presa de la senyal bioelèctrica que es col·loca a la superfície de l'epiteli nasal (elèctrode nasal de perfusió) i un electròde de referència subcutani (82).

Figura 34: Dispositiu Tholly Medicap®.

### 1.8.3.2 Material fungible

- Dos elèctrodes de plata/Clorur de plata
- ✓ Elèctrode de mesura integrat al llapis mesurador (figura 35)

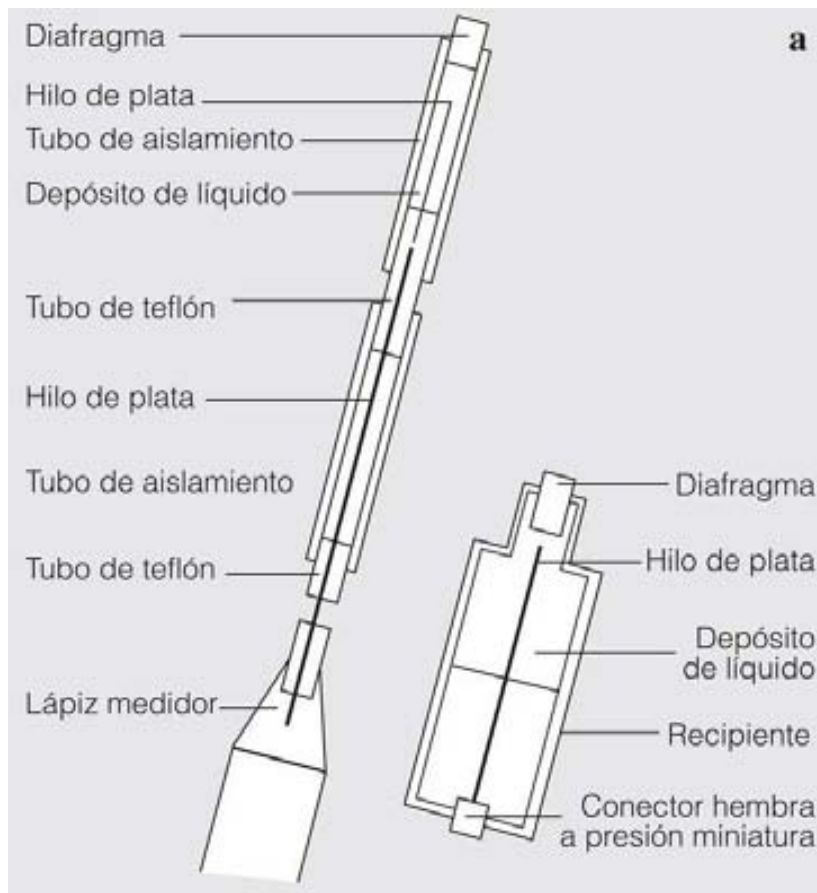


Figura 35. Observis l'elèctrode de mesura integrat al llapis mesurador i a la dreta, en petit, un detall de la part superior d'aquest catèter.

✓ Elèctrode de referència: és més petit que el de mesura (figura 36). Es connecta a un catèter subcutani que es col·loca a l'avantbraç. Tant l'elèctrode com el catèter s'han de perfondre amb una solució de Ringer.



Figura 36. Elèctrodes de referència i de mesura nasal

Els elèctrodes s'han de conservar en tubs de plàstic plens d'una solució de clorur de plata saturada. Després de cada us, aquesta solució s'ha de substituir per una nova solució de Clorur de plata.

- Bombes de perfusió: 4 bombes d'infusió Braun®, una per cada solució. Han d'anar connectades a xeringues de 50cc, una sonda de Foley 8F i una clau de 2 passos (figura 37).
- Especulum nasal amb una font de llum freda (Storz®, Germany) (figura 38) .
- Paper d'impressió tèrmic que porta incorporat el Dispositiu Tholy
- Xeringues amb les respectives solucions: Ringer, d'amilorida, lliure de clor i d'isoproterenol, preparades 2 hores abans d'iniciar la determinació (figures 39 i 40)
- Apòsit per fixar el catèter



Figura 37. Bomba d'infusió

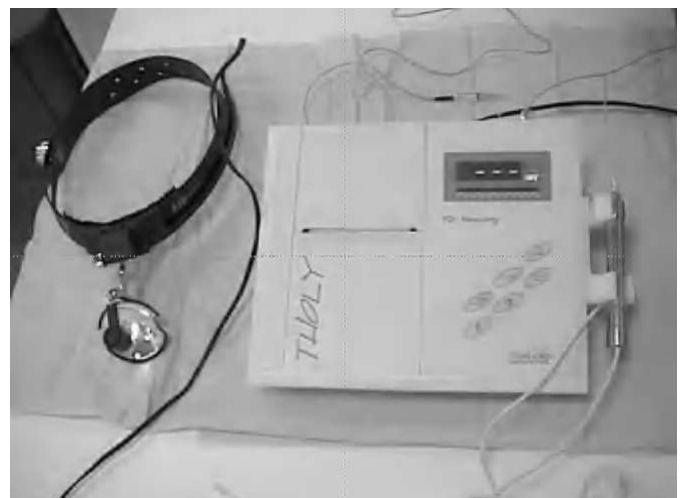


Figura 38. Especulum nasal amb una font de llum freda (Storz®, Germany) i voltímetre Tholy



Figura 39. Xeringues carregades amb les solucions.



Figura 40. Solucions per irrigació nasal

### 1.8.3.3 Solucions per irrigació

Son 4:

- Solució A: Ringer (135 mM Cl Na; 1,2 mM Cl<sub>2</sub> Mg; 2,25 mM Cl<sub>2</sub> Ca)
- Solució B: Amilorida (Ringer + 0.1 mM d'hipoclorit d'amilorida)
- Solució C: Solució lliure CL (hipoClorit d'amilorida + 135 mM de gluconat sòdic + 1.2mM de SO<sub>4</sub> Mg + 2.2 mM de gluconat Càlcic )
- Solució D: Isoproterenol (Solució C + 0.01 mM d'hipoclorit d'isoprotenerol)

Les Solucions A, B, i C es poden guardar al frigorífic uns 3 mesos o congelades 6 mesos  
La solució D ha d'ésser preparada 2 hores abans d'utilitzar-se.

### 1.8.3.4 Calibratge del voltímetre (figura 41)

Abans de cada mesura, s'ha d'efectuar el calibratge del voltímetre i s'ha de comprovar el funcionament i l'estabilitat dels elèctrodes utilitzats.

El procediment es el següent: es posen en contacte els extrems dels elèctrodes de referència i de mesura per crear un curtcircuit, de manera que el voltímetre no detectarà corrent (elèctrodes aptes i voltímetre ben calibrat). És possible que la pantalla registri un valor d'uns pocs milivolts; llavors s'ha de prémer el botó "0" per equilibrar els elèctrodes assegurant-se de que estiguin en contacte.



Figura 41. Calibratge del dispositiu

#### 1.8.3.5 Preparació del malalt

El pacient ha d'estar relaxat, assegut en una butaca còmoda, la mandíbula recolzada en un optímetre que no bloquegi la sortida de les perfusions. S'han d'inspeccionar i explorar les dues narines. Si el malalt presenta una afecció aguda del nas, s'haurà de retardar la prova una setmana com a mínim.

Es col·loca la sonda de Foley de 8F al nas (figura 42). La sonda Foley ha d'estar connectada a una clau de 2 passos. A continuació l'elèctrode nasal. L'elèctrode nasal ha d'estar col·locat a una narina, entre el cornet inferior i la base del nas i a una profunditat entre 0.5 cm i 2 cm (figura 43).

En la cara externa de l'avantbraç del pacient, un cop desinfectat, es col·loca el catèter de referència connectat a un catèter subcutani que s'introdueix al teixit adipós subcutani. Aquest catèter de referència es perfon amb una solució Ringer.



Figura 42. Col·locació de l'elèctrode de mesura nasal i de la sonda de Foley 8F



Figura 43. Detall de la visualització del cornet i col·locació de l'elèctrode de Mesura nasal



Figura 44. Pantalla per visualitzar la mesura

#### 1.8.3.6 Procediment de mesura (78)

Primer es connecta el dispositiu a la corrent, després es connecten els elèctrodes al dispositiu, es calibra el voltímetre i s'inicia la mesura de la DPN. Mentre es prepara el dispositiu, s'escalfen les solucions a 37 °C.

Es comprova que els catèters estiguin col·locats enfront del lloc anatòmic de mesura. En aquest moment a la pantalla del dispositiu del Tholy ha d'aparèixer un valor de DPN de pocs mV que al moviment alguns dels catèters ha de variar lleugerament (figura 44).

Si la posició de l'elèctrode és correcta al tocar la part posterior del cornet inferior amb l'elèctrode de mesura, la pantalla ha d'indicar valors entre -5 mV i -10mV. Aquests valors s'han de mantenir durant un minut. Llavors es procedeix a fixar l'elèctrode de mesura (figura 45).

Després, es posa al nas la sonda de Foley de 8 Frenchs connectada a una clau de 2 pasos i a les bombes Braun (una bomba amb una xeringa de 50 cc per cada perfusió). En el moment de la irrigació, les diferents solucions han d'estar a 37°C. La perfusió de les diferents solucions s'ha de mantenir durant un temps de 3 minuts a una velocitat de 300 ml/h. (79) (figura 46).

Després de 3 minuts de perfusió de cada solució i d'assolir l'estabilització dels valors de DPN durant 1 minut, es registre i s'imprimeix el resultat (prement el botó END del voltímetre).

Al final de la prova es torna a enregistrar el valor basal amb la solució de Ringer per comprovar la fiabilitat i la reproductibilitat de la prova.

El procediment de mesura es repeteix a l'altra narina, seguint el mateix protocol.

Figura 45. Posició del malalt en el moment en que es col·loca el dispositiu de mesura al nas del pacient



Figura 46. Detall de la perfusió . Bomba Braun. Dispositiu de mesura Tholy

#### 1.8.3.7 Interpretació de resultats numèrics i gràfics

Es una prova molt dependent del tècnic. Es poden trobar variacions substancials interlaboratoris. Per aquest motiu és preceptiu que cada laboratori disposi dels seus valors de referència. Per això es necessari que els tècnics hagin fet un número mínim de determinacions. Els consensos internacionals aconsellen per tal de poder acreditar al tècnic i considerar la prova vàlida, que el tècnic hagi realitzat entre 300 i 400 determinacions. Els valors de DPN en els pacients han estat descrits prèviament (apartat 1.6.3). Per valorar un resultat de DPN s'ha de comprovar que els resultats de les mesures corresponents a cada solució son compatibles amb els resultats de referència per cada solució. Es molt important comprovar els increments de valors entre cada solució. Tan important com el valor de la DPN és la morfologia de la corba (figura 47). La magnitud de les diferències de potencial oscil·len entre 0 i -100 mV: Si es sobrepassen aquests límits s'ha de comprovar la posició de l'elèctrode de mesura i de l'elèctrode de referència i repetir la mesura.

Un valor patològic en una sola narina no te cap valor. El valor definitiu es la mitja aritmètica dels valors obtinguts de les mesures de les dues narines per cada una de les perfusions.

Tan important com el valor numèric de la DPN és la morfologia de la corba de mesurament: a) corba aplanada corresponent a una persona sana; b) gràfica amb una corba típicament característica de fibrosi quística (figura 48).

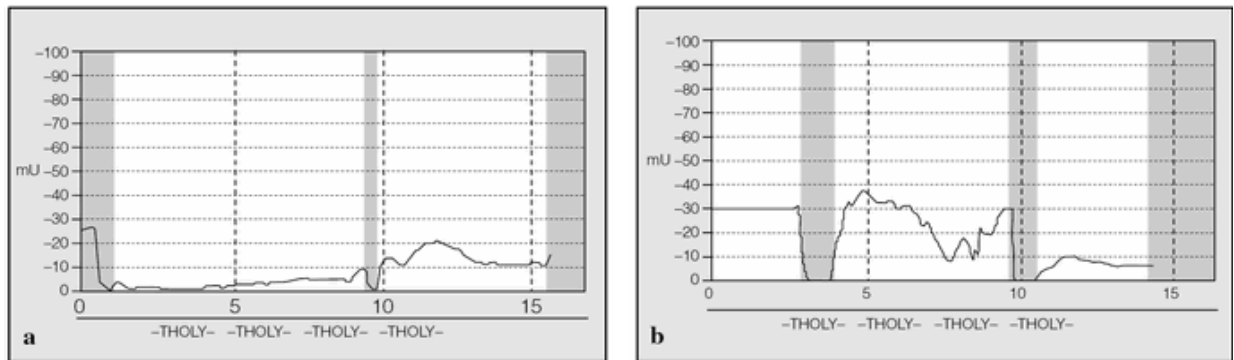


Figura 47. Gràfiques de la mesura de la DPN en un individu Normal (A) i un malalt amb FQ (B).

#### 1.8.4.- Interès clínic

El diagnòstic de FQ comporta un seguiment de la malaltia en una Unitat de referència i un tractament especialitzat i diferenciat que proporcioni un millor pronòstic del malalt. El diagnòstic de FQ de formes no clàssiques és un repte en l'actualitat ja que precisa d'un procés diagnòstic molt complex. Això permet millorar la qualitat de vida, disminuir la morbi-mortalitat així com poder establir un consell genètic. Per poder realitzar el diagnòstic de les formes no clàssiques és necessari l'estudi "in vivo" de la funció de la CFTR.



## **2 JUSTIFICACIÓ GENÈRICA DELS ESTUDIS**

Avui en dia, el diagnòstic de FQ es basa fonamentalment en els criteris diagnòstics de Rosenstein (41). A la pràctica però el diagnòstic no és tan senzill, doncs la clínica dels pacients amb FQ pot ser molt variada i els valors de Cl- obtinguts mitjançant la prova de la suor en pacients amb clínica atípica, poden no ser concloents. No es infreqüent que la prova de la suor doni valors intermedis o normals que no aclareixen el diagnòstic. Actualment una prova de la suor normal no exclou de forma definitiva el diagnòstic de la malaltia (84). Així doncs, les formes no clàssiques i les formes monossimptomàtiques de FQ poden tenir una prova de la suor normal o dubtosa i una o cap mutació de la CFTR. Això es especialment manifest en el cas de les bronquièctasi difuses que no solen associar-se a altres manifestacions clíniques típiques de la FQ com insuficiència pancreàtica o infertilitat masculina. En aquests malalts en l'actualitat, s'ha de realitzar forçosament un estudi genètic per poder establir el diagnòstic de FQ, prova que comporta una despesa econòmica notable.

Per poder realitzar el diagnòstic de FQ en aquests malalts, s'aconsella utilitzar una prova funcional de la CFTR que demostrï "in vivo" de manera fiable el funcionament de la proteïna. La prova descrita darrerament i més fiable es la mesura de la diferència de potencial nasal (DPN). Aquesta tècnica precisa per una banda l'aprenentatge de la tècnica i disposar de valors de referència del centre on es practica i per altre banda s'ha de conèixer la utilitat d'aquesta mesura en els malalts amb bronquièctasi difuses idiopàtiques (BDI).

## **3 HIPÓTESIS GENERAL**

La mesura de la diferència de potencial nasal és una prova discriminatòria per poder realitzar el diagnòstic de FQ en malalts amb bronquièctasi difuses.

## **4 PRIMER ESTUDI: APRENENTATGE DE LA TÈCNICA I DETERMINACIÓ DELS VALORS DE REFERÈNCIA**

### **4.1 Justificació**

La DPN és una de les úniques proves "in vivo" per demostrar la funció de la CFTR. Es una prova necessària per poder realitzar el diagnòstic de les formes atípiques o no clàssiques de FQ però es precisa que el centre que la practica disposi de personal tècnic entrenat de manera que els resultats siguin reproduïbles. Aquest aspecte es bàsic ja que la prova de la DPN es una prova tècnic-dependent. Un cop assolit aquest punt, la mesura de la DPN pot esdevenir un criteri definitiu pel diagnòstic dels malalts amb FQ i prova de la suor negativa o intermedia, amb una o cap mutació del gen de la CFTR. Per considerar els resultats fiables i reproduïbles, els diferents consens estimen que la xifra de determinacions que ha d'haver fet un tècnic oscil·la entre 300 i 400 determinacions.

### **4.2 Hipòtesi**

La determinació de la mesura de la DPN realitzada per un tècnic experimentat seguint un protocol estandarditzat es útil pel diagnòstic de Fibrosi Quística o de malaltia relacionada amb disfunció de la CFTR. Per considerar el tècnic experimentat s'han de realitzar entre 300 i 400 determinacions.

### **4.3 Objectius**

- 1.- Realització per part del tècnic la xifra de mesures de DPN basal demanada per la literatura per fer fiablement aquesta tècnica
- 2.- Constatar en el nostre laboratori la repetibilitat de la tècnica
- 3.- Establir en el nostre laboratori els valors de referència de DPN basals en malalts afectats de FQ, portadors sans i controls
- 4.-Valoarar si la mesura de la DPN basal en els malalts amb BDI pot ajudar al diagnòstic de FQ.

### **4.4 Material i Mètodes**

#### **4.4.1 Població: classificació dels malalts en grups**

Varem estudiar 88 individus dividits d'entrada en 5 grups

4.4.1.1 Controls sans no portadors de mutacions *CFTR* (Grup A). Individus sans, no fumadors, sense clínica respiratòria, rinosinusal, ni malabsorció intestinal, amb dues proves de la suor negatives, placa de tòrax i sins normals, funció respiratòria normal i sense cap mutació pel la *CFTR*. Considerats com a grup control.

4.4.1.2 Fibròtics quístics (FQ clàssica), portadors de 2 mutacions *CFTR* (Grup B). Pacients amb diagnòstic de FQ, clínica compatible, 2 proves de la suor patològiques i 2 mutacions de la *CFTR*.

4.4.1.3 Pacients adults amb bronquièctasis difuses portadors d'una mutació *CFTR* (Grup C)

Pacients amb prova de la suor negativa o amb valors límit.

4.4.1.4 Pacients adults amb bronquièctasis difuses no portadors de cap mutació de la *CFTR* (Grup D). Pacients amb prova de la suor negativa o amb valors límit.

4.4.1.5 Individus sans portadors d'una mutació de *CFTR* (Grup E). Familiars sans (pares o germans de malalts amb FQ), no fumadors, sense clínica respiratòria, rinosinusal, ni malabsorció intestinal amb 2 proves de la suor negatives, placa de tòrax y de sins normal, funció respiratòria normal i portadors d'una mutació de la FQ.

#### 4.4.2 Prova de la diferència de potencial nasal

La tècnica es va realitzar com s'ha especificat prèviament a l'apartat 1.8.3. Només es va realitzar la mesura basal. Es va programar que el tècnic realitzes un nombre de determinacions de DPN entre 300 i 400. Es varen realitzar mesures basals de DPN a cada individu la meitat a la narina dreta i l'altra meitat a la narina esquerra. El valor final de la DPN va ser el valor obtingut de la mitjana aritmètica entre els valors de DPN obtinguts a la narina dreta i els obtinguts a la narina esquerra.

#### 4.4.3 Protocol d'estudi d'individus per diferenciació de grups.

Es va estudiar la població d'individus mitjançant història clínica (especial èmfasi en la clínica respiratòria, rinosinusal i síndrome de malabsorció intestinal), dues proves de la suor, radiologia de tòrax i sins, proves de funció respiratòria i estudi genètic (a tots els pacients se'ls va realitzar un estudi genètic pel gen de la *CFTR*) i DPN.

Cal destacar que la prova de la suor es va fer i interpretar de la següent de manera:

- Es va realitzar dues vegades en 2 períodes de temps diferents. La prova de la suor es va mesurar a cada malalt per dues tècniques, conductància i determinació bioquímica del clor. El valor de la prova de la suor de cada pacient que es va acceptar va ser la mitjana aritmètica dels 2 valors de Cl - de cada una .

- Valors de normalitat acceptats de la prova de la suor:

Prova mesurada per conductància: patològica quan el valor de Cl > 80 mEq/L. Es van considerar valors límits quan els valors de Cl oscil·laven entre 50 i 80 meq Cl.

Prova mesurada per bioquímica: patològica quan Cl > 60 meq /L. Es van considerar valors límits quan els valors de Cl oscil·laven entre 40 i 60 meq / L.

En cas de divergència de resultats, es va acceptar com a més fiable la determinació de Cl per bioquímica

Els malalts portadors de bronquièctasis varen ser estudiats d'acord amb el protocol del Servei de Pneumologia de la Corporació Parc Taulí especificat prèviament (pàgina 40).

A tots els individus se'ls va mesurar la DPN 4 vegades (dues a cada nariu). D'acord amb els resultats de Hofmann et al (76 ) es van considerar valors de DPN normals  $\geq -20$  mV i diagnòstics de FQ  $\leq -45$  mv.

#### 4.4.4 Anàlisi estadística

Les dades es van introduir en el paquet estadístic SPSS versió .18.

Es va determinar la repetibilitat de la tècnica mitjançant el coeficient de correlació interclasse (ICC), amb límits superiors i inferiors per un interval de confiança del 95 %. Es va realitzar una prova de Blandt i Altman per la totalitat del grup i per tres subgrups. El primer subgrup fou el primer terç de malalts estudiats, el segon subgrup el segon terç i el tercer el darrer.

Es va determinar el valor predictiu positiu (VPP) i negatiu (VPN), especificitat (E) i sensibilitat (S) de la DPN. Pel que fa l'obtenció dels valors de referència dels diferents grups, els resultats s'expressen en forma de mitjana  $\pm$  desviació standart. La comparació entre grups es va fer mitjançant l'anàlisi de la variança (ANOVA amb la correcció de Bonferroni).

### 4.5 Resultats

#### 4.5.1 Resultats de la tècnica

Es varen realitzar 354 mesures basals de la DPN en els 88 pacients estudiats. De les 352 se'n van analitzar 346 (es van rebutjar 8 mesures). Per procedir a l'estudi de repetibilitat es varen comparar les mesures de dues en dues respectant el temps de realització. El coeficient de correlació intraclasse va ser de 0,857 amb uns límits superior del 0,891 i inferior de 0,815.

Els CCI de cada subgrup està en la taula 5.

	<b>Número de Mesures</b>			<b>Interval de 95%</b>	
<b>Grups</b>	<b>Totals</b>	<b>Excloses</b>	<b>Coefficient de Intraclasse</b>	<b>Límit inferior</b>	<b>Límit superior</b>
<b>Grup total</b>	173	8	,857	,815	,891
<b>Subgrup 3</b>	56	7	,898	,841	,937
<b>Subgrup 2</b>	55	0	,825	,726	,892
<b>Subgrup 1</b>	54	1	,292	-,103	,564

Taula 5. El CCI de tot el grup es molt bo, però observis com millora progressivament des del subgrup 1 (primer grup de malalts estudiats) fins el subgrup 3 (darrer grup de malalts estudiats).

Es van representar els resultats en forma de gràfic de Blandt i Altman.

La figura 48 mostra els valors de les mesures dels tres grups en conjunt i la figura 49 mostra la representació dels tres grups per separat.

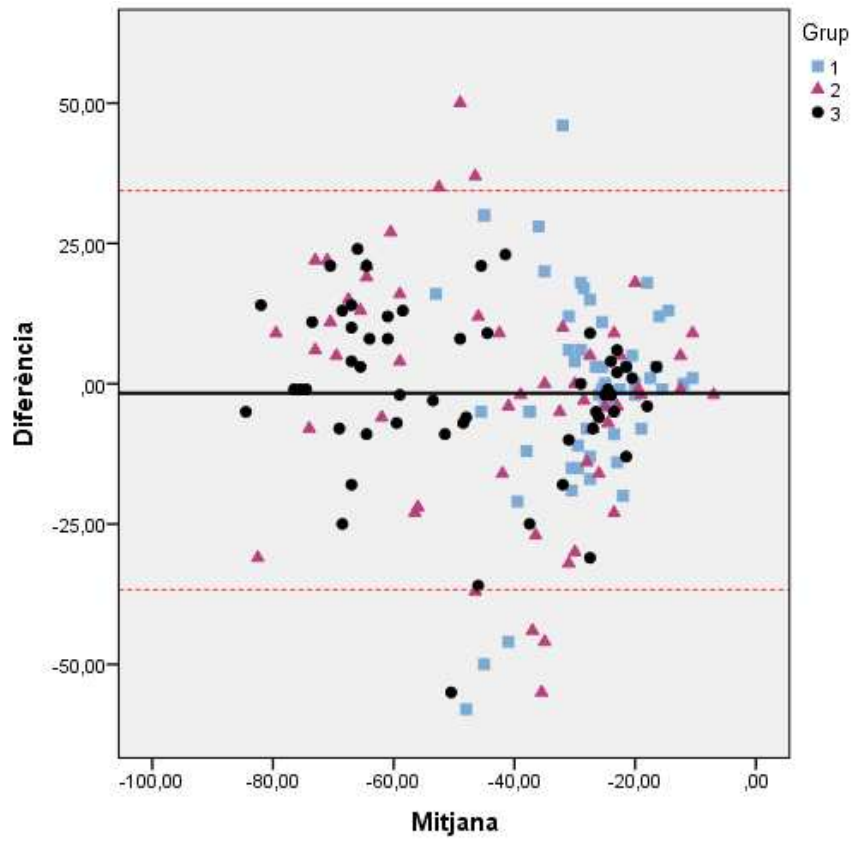


Figura 48. Les mesures del grup 1 es representen en blau cel, les del grup dos en vermell i les del tres en blau cel.

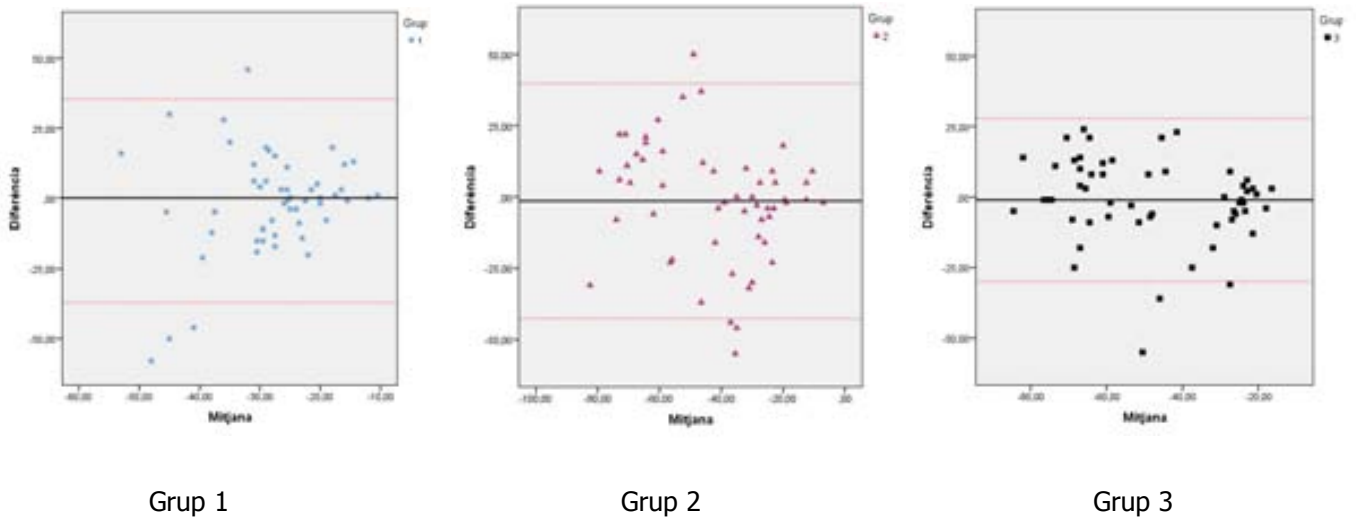


Figura 49. Observis que en el grup tres els valors estan més agrupats.

Per procedir a la determinació de la sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu (VPP) i negatiu (VPN), es van comparar els valors obtinguts de la DPN (considerant-se valors de DPN normals  $\geq -20$  mV i diagnòstics de FQ  $\leq -45$  mv) i la prova de la suor amb el diagnòstic basat en la clínica + al menys una mutació en l'estudi genètic.

	<b>DPN</b>	<b>Prova de la suor</b>
<b><i>Sensibilitat (%)</i></b>	91,7	77,8
<b><i>Especificitat (%)</i></b>	80	100
<b><i>VPP (%)</i></b>	78	100
<b><i>VPN (%)</i></b>	92,3	77,8

Taula 6. Resultats de sensibilitat, especificitat, VPP i VPN d'ambdúes tècniques.

#### 4.5.2 Valors de referència de diferència de potencial nasal dels diferents grups.

Es van estudiar 88 individus dividits en els 5 grups segons la classificació diagnòstica

L'edat dels malalts s'exposa en la taula 7.

	<b>N</b>	<b>Edat Mitjana±DE</b>	<b>Mediana</b>	<b>Minim</b>	<b>Máxim</b>
<b>Grup A</b>	15	39,7±10,5	39,5	20	60
<b>Grup B *</b>	17	21±7,2	22	9	35
<b>Grup C</b>	4	57,1±11,2	56	37	75
<b>Grup D</b>	22	62±12,5	67	32	77
<b>Grup E</b>	30	44,7±7,9	45	27	59

Taula 7 . Nombre de malalts per grup i edat.

\* p= 0.0014. Solament els malalts del grup B varen ser mes joves respecte al grup A. La resta dels grups no varen mostrar diferències d'edat entre ells.

Els resultats dels estudis genètics dels pacients amb FQ (grup B ) i portadors (Grup E) es mostren a les taules 8 i 9.

	<b>Freqüència</b>	<b>Percentatge</b>
1811+1,6KBA>G/Q1100P	2	11,8
3849+1G>A/9TM/V	1	5,9
DELTA F508/1812-1G-A	1	5,9
DF508/D924N	1	5,9
DF508/DF508	6	35,3
DF508/N1303K	1	5,9
DF508/R709X	1	5,9
DF508/Y1014C	3	17,6
L997F/DF508	1	5,9
Total	17	100,0

Taula 8. Estudi genètic dels malalts amb FQ

	Freqüència	Percentatge
1716G/A /-	1	3,3
1716G/A7-	1	3,3
1812-1G-A/-	1	3,3
389+1G>A/-	1	3,3
A1006E/-	1	3,3
DF508/-	16	50,0
I507D/-	1	3,3
L997F/-	1	3,3
N1303K/-	2	6,7
Q1100P/-	1	3,3
R709X/-	1	3,3
R75Q/-	1	3,3
Y1014C/-	2	6,7
Total	30	100,0

Taula 9. Estudi genètic dels portadors

Valors de DPN de cada grup

Les mesures de la DPN dels 5 Grups i de la prova de la suor es mostren en la taula 10.

L'anàlisi de la variància (ANOVA) va mostrar unes diferències estadísticament significatives intergrups. La comparació grup per grup va demostrar per la DPN una diferència estadísticament significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grup B i els grups A, D i E.

Pel que fa la prova de la suor, la diferència va ser estadísticament significativa ( $p < 0.001$ ) entre el Grup B i tots els altres grups.

Grups	A	B	C	D	E
<b>N</b>	15	17	4	22	30
<b>DPN (mV)</b>	-25± 22,1	-62,1±16,7*	-63,4±7,9*	-46,7±16,02	-42,5±15,6
<b>Prova de la Suor (meq/L)</b>	27,46±15,41	104,08±27,79**	58,75±19,25	37,26±15,41	25,87±7,58

Taula 10. Resultats dels valors basals de la DPN i de la prova de la suor en els 5 grups.

\* $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.001$ .



Els 4 malalts del grup C varen ser portadors d'una mutació de la CFTR i tots 4 tenien valors de DPN patològics ( $< -45\text{mV}$ ) (sensibilitat del 100%), com els FQ. En canvi pel que fa l'anàlisi de la prova de la suor (taules 10 i 11) 2 malalts tenen proves de la suor normals ( $\text{Cl}^- < 80 \text{ mEq/L}$  mesurat per conductància i  $< 60 \text{ mEq/L}$  mesurat per determinació bioquímica); malalts 1 i 2 mentre que els altres dos presenten valors de clor a la suor intermitjos tant si la mesura del  $\text{Cl}^-$  es per conductància (  $79 \text{ mEq/L}$  i  $71 \text{ mEq/L}$ ) com per determinació bioquímica ( $45$  i  $40 \text{ mEq/L}$  ). En principi doncs, d'acord amb els criteris clàssics basats amb la prova de la suor, aquestos malalts serien considerats no FQ;en canvi la prova de la DPN permet realitzar el diagnòstic.

	<b>Prova de la suor (conductància/ bioquímica)</b>	<b>Mutació</b>
<b>Malalt 1</b>	45 mEq $\text{Cl}^-$ / 24 meq $\text{Cl}^-$	Q178K/-
<b>Malalt 2</b>	40 mEq $\text{Cl}^-$ / 21qmeq $\text{Cl}^-$	W1282X/-
<b>Malalt 3</b>	79 mEq $\text{Cl}^-$ / 45 meq $\text{Cl}^-$	1807M/-
<b>Malalt 4</b>	71 mEq $\text{Cl}^-$ / 40 meq $\text{Cl}^-$	R1162L/-

Taula 11. Estudi genètic i proves de la suor en el malalts del grupC amb bronquièctasi difuses portadors de mutacions i DPN alterada

#### 4.6 Discussió

Clàssicament, el diagnòstic de FQ es realitza mitjançant la clínica compatible acompanyada de dues proves de la suor patològiques. En els fons, la prova de la suor es l'expressió "in vivo" de la disfunció de la CFTR. L'existència de casos dubtosos de FQ i el millor coneixement del funcionament de la CFTR van motivar que la recerca s'orientés cap a l'estudi de tècniques diagnòstiques més sensibles i discriminatòries. Des d'un punt de vista fisiopatològic, la base de la malaltia radica en l'alteració iònica que es produeix com a conseqüència del mal funcionament de la proteïna anomenada CFTR. Això provoca uns canvis elèctrics en la superfície cel·lular que són mesurables. La DPN mesura aquests canvis en la mucosa nasal.

La DPN s'ha proposat com una eina útil per demostrar les alteracions en el transport epitelial de clor secundari a disfunció de la CFTR i conseqüentment com a prova útil pel diagnòstic de FQ especialment en els pacients amb formes atípiques o no clàssiques, (41, 45).

El problema d'aquesta tècnica es que està poc implementada encara en l'assistència mèdica habitual d'aquests malalts i que la seva fiabilitat depèn de l'experiència del tècnic que la realitza i que es desconeixen alguns aspectes com el seu valor predictiu positiu i negatiu comparat amb la prova de la suor.

Nosaltres hem determinat la mesura de la DPN basal en diferents grups d'individus que inclouen malalts amb diagnòstic de FQ clàssica, malalts amb bronquièctasis difuses i portadors d'una mutació de CFTR, pacients diagnosticats de bronquièctasis difuses sense cap mutació de FQ, portadors sans d'una mutació CFTR i individus sans sense cap mutació.

La nostra tècnica ha realitzat 352 determinacions. Tenint en compte que la literatura (47) aconsella que, perquè el tècnic es consideri entrenat ha d'haver fet entre 300 i 400 determinacions aquest punt s'ha assolit sobradament. El segon aspecte important lligat tant al tècnic com a la tècnica és la repetibilitat de la mateixa. Els criteris de repetibilitat : són els criteris que s'utilitzen per mesurar la consistència entre mesures repetides d'un mateix caràcter en un mateix individu. En altres paraules, són els criteris que s'utilitzen per demostrar que una maniobra no tingui una variabilitat excessiva. D'acord amb el VIM (Vocabulari Internacional de Metrologia ), la repetibilitat de resultats dels mesuraments és la proximitat de concordança entre els resultats dels mesuraments successius del mateix mesurant sota les mateixes condicions de mesurament. Aquestes condicions son anomenades condicions de repetibilitat. Les condicions de repetibilitat inclouen:

- a) El mateix procediment de mesura
- b) El mateix observador
- c) El mateix instrument de mesura utilitzat sota les mateixes condicions
- d) El mateix lloc
- e) La repetició de la prova

D'acord amb el VIM, la reproductibilitat de resultats de mesuraments és la proximitat de concordança entre els resultats de mesuraments successives del mateix mesurant sota condicions de mesura que canvien. Una declaració vàlida de reproductibilitat requereix que s'especifiqui la condició que canvia. A la reproductibilitat, les condicions que canvien poden incloure: a) Principi de mesura; b) Mètode de mesura; c) Observador; d) Instrument de mesura; e) Patró de referència; f) Lloc; g) Condicions d'ús; h) Temps.

(83 i 84). Nosaltres per tant varem estudiar la repetibilitat i no la reproductibilitat de la tècnica. Les nostres dades mostren una repetibilitat molt elevada.

L'especificitat i sensibilitat de la tècnica han estat molt elevades així com el seu VPP i el VPN, de manera que una determinació de DPN negativa pràcticament exclou la malaltia. Les nostres dades de sensibilitat i especificitat son concordants amb les de la literatura (45).

Comparant amb la prova de la suor, la mesura de la DPN ha mostrat ser més sensible i un valor predictiu negatiu (VPN) més elevat, però menys específica que la prova de la suor possiblement per ser tècnic-dependent.

A la pràctica, això volt dir que una DPN basal normal (valor de DPN  $> -20$  mV), descarta pràcticament FQ mentre que la prova de la suor no ho permet. A més, una DPN basal patològica permetria un diagnòstic de FQ tot i que la prova de la suor fos normal. De tota manera, s'ha implementat la mesura de la DPN després de la irrigació nasal amb diverses solucions la qual cosa ha modificat aquesta conclusió preliminar (46).

L'anàlisi per subgrups, ha mostrat que en el grup de malalts amb FQ, la DPN ha resultat tant sensible com la prova de la suor doncs tots els nens diagnosticats de FQ tenien un valor de Clor a la suor  $> 60$  meq /L i un valor de DPN inferior a  $-45$  mV.

Els 4 malalts amb bronquièctasi i portadors d'una mutació de FQ tenien valors de DPN superposables als del grup de FQ, però en canvi la prova de la suor mostrava valors normals o intermedis. L'estudi genètic d'aquest malalts va demostrar que eren tots portadors d'una mutació *CFTR*. Aquest fet ha permès un canvi de diagnòstic dels pacients i per tant la correcta filiació dels malalts amb bronquièctasi difuses. Els nostres resultats estan en la línia de Hubert et al (85), autors que han demostrat que una única mutació *CFTR* en malalts afectes de bronquièctasi difuses, pot tenir conseqüències patogèniques. En canvi en el grup dels malalts amb bronquièctasi i valors de DPN superposables als controls sans, en cap cas es va trobar una mutació FQ.

Els nostres resultats i els de Hubert et al (85) recolzen una revisió dels algorismes diagnòstics de la FQ ja que la majoria d'ells només es basen en la prova de la suor com a única prova "in vivo" pel diagnòstic de la FQ. Això es especialment rellevant en malalts monossimptomàtics. D'acord amb els nostres resultats, la determinació de la DPN s'hauria de fer abans de procedir a l'estudi genètic en pacients amb bronquièctasi difuses amb prova de la suor normal. La finalitat de la prova és doncs evidenciar la disfunció de la CFRT.

En resum, la DPN basal és una prova mínimament invasiva i poc costosa, amb bona repetibilitat, que permet diferenciar els malalts FQ dels no FQ essent d'especial interès en les formes monossimptomàtiques o per les formes no clàssiques de FQ. En les bronquièctasi no filiades la DPN

s'ha mostrat més sensible que la prova de la suor, el que ha permès un canvi de diagnòstic dels pacients. A més, pot evitar la realització d' estudis genètics en cassos amb bronquièctasis difuses i DPN normal.

#### **4.7** Conclusions

- 1.- El nostre tècnic ha fet 352 determinacions de manera que compleix els requisits especificats en la literatura per considerar-se apte per fer la tècnica correctament.
- 2.- Hem demostrat que en el nostre laboratori la tècnica té una bona repetibilitat.
- 3.- Hem establert uns valors de DPN basal de referència pel nostre laboratori en els malalts afectats de FQ, portadors sans i controls.
- 4.- Hem evidenciat que en alguns pacients afectes de bronquièctasis difuses no filiades, la determinació de la DPN basal permet el diagnòstic de FQ.

## **5. SEGON ESTUDI: Utilitat de la mesura de la Diferència de Potencial Nasal en Fibròtics Quístics que presenten un fenotip de Bronquièctasis difuses idiopàtiques**

### **5.1 Justificació**

La utilització de la prova de la diferència de potencial nasal (DPN) pel diagnòstic de la FQ, està acceptada des del consens diagnòstic de Rosenstein de 1998 (41). Avui per avui la determinació de la prova de la suor segueix considerant-se la prova de referència pel diagnòstic de FQ (86-87) .

Gràcies a l'avenç tècnic i al coneixement de la fisiopatologia de la malaltia s'han anat desenvolupant noves proves diagnòstiques, com els estudis genètics i l'estudi "in vivo" de la funció de la proteïna CFTR, mitjançant la prova de la diferència de potencial (DP) (88), de manera que avui en dia alguns pacients amb clínica suggestiva de FQ que presenten proves de la suor al límit de la normalitat o fins i tot normals, poden ser considerats com FQ o com a malaltia relacionada amb la CFTR (89). Els malalts monosimptomàtics amb una determinació de la DPN patològica i portadors d'una mutació de la *CFTR*, se'ls podria incloure com a malalts afectats de FQ com apunten molts autors que s'estàn replantejant en l'actualitat els algoritmes diagnòstics de la FQ.

Una de les formes monosimptomàtiques que s'estant incluent en els algoritmes diagnòstics de la FQ son les bronquièctasis difuses (BD) amb proves de la suor normals, amb una o cap mutacions de la *CFTR*.

En aquests malalts la determinació de la DPN podria permetre millorar els criteris diagnòstics de FQ.

Gràcies a aquesta tècnica doncs es podria:

- .- Caracteritzar i identificar nous malalts.
- .- Millorar el diagnòstic etiològic de les bronquièctasi.
- .- Escurçar el temps d'estudi i diagnòstic de la malaltia.
- .- Evitar la despesa econòmica que comporta l'estudi genètic exhaustiu de tot el gen *CFTR*.

### **5.2 Hipòtesi**

La determinació del valor de la diferència de potencial (DPN) es una prova útil en el diagnòstic de FQ o de la disfunció de la CFTR. Permet confirmar o descartar la malaltia en pacients amb bronquièctasis difuses essent especialment rellevant en malalts amb prova de la suor negativa o intermèdia (valors de clor a la suor entre 40 i 60 mmol/L).

### 5.3 Objectius

1. Determinar els valors de la DPN basal i després de la irrigació de la mucosa bronquial amb diverses solucions, en el grup de malalts afectats per la forma clàssica de FQ, malalts amb bronquièctasis difuses no filiades i en un grup control de sans no portadors de cap mutació.
2. Comprovar que la prova de la DPN pot confirmar o excloure el diagnòstic de FQ o disfunció de CFTR en els malalts amb bronquièctasis difuses i prova de la suor no patològica.
3. Valorar si la prova de la DPN basal pot ser útil com a cribratge diagnòstic en els pacients amb bronquièctasi difuses.
4. Descriure el percentatge de mutacions de la CFTR observades en malalts amb bronquièctasis difuses amb prova de la suor normal i prova de la DPN patològica.
5. Valorar si la severitat de les mutacions de la CFTR en malalts amb bronquièctasis difuses (BD), prova de la suor normal i prova de la DPN patològica, son de diferent classe que les dels malalts amb FQ clàssica

## 5.4 Material i Mètodes

### 5.4.1 Població: Classificació dels malats en grups:

Es van estudiar 173 pacients classificats en els següents grups.

5.4.1.1 Fibròtics quístics (grup A). 17 pacients afectes de Fibrosi Quística, edat superior de vuit anys diagnosticats per malaltia típica respiratòria i/o símptomes gastrointestinals clàssics, amb dues proves de la suor patològica, efectuades en dos dies diferents. Aquests malalts tots eren portadors de dues mutacions *CFTR* conegudes a Espanya. Cap dels 17 malalts varen ser diagnosticats per cribratge neonatal

5.4.1.2 Pacients adults diagnosticats de bronquièctasis difuses i idiopàtiques (BDI) (grup B). En l'actualitat no fumadors. En tots els malalts es va practicar un estudi genètic de les mutacions *CFTR* amb inclusió dels al·lels 5T, 7T i 9T, dues proves de la suor complertes per conductància (Macroduct) i dues determinacions posteriors de clor per bioquímica.

5.4.1.3 Pacients sans portadors d'una mutació *CFTR* (grup C). Tots ells pares o germans dels pacients del grup A. A tots ells se'ls hi va practicar una radiografia de tòrax i de sins que havien d'ésser absolutament normals, una espirometria normal, dues proves de la suor per conductància (Macroduct) i dues determinacions posteriors del Cl<sup>-</sup> de la suor per bioquímica.

5.4.1.4 Controls sans respecte la malaltia FQ (grup D). Malalts no fumadors, sense antecedents d'asma bronquial, tos crònica, rinitis ni problemes de malabsorció intestinal. A tots ells, se'ls va practicar una radiografia de tòrax i de sins i un estudi de funció pulmonar (que havien d'ésser estrictament normals), dues determinacions de la prova de la suor complerta (Macroduct) i després dues determinacions posteriors del clor de la suor per bioquímica i estudi genètic de la *CFTR* incloent els al·lels 5T, 7T i 9T.

### 5.4.2 Protocol d'estudi

Es va aplicar el protocol d'estudi de bronquièctasi de la CPT. Es detallen a continuació algunes proves específiques.

5.4.2.1 Prova de la suor: es determinava primer per la tècnica de Conductància (Macroduct) i a continuació es passava a efectuar la determinació de la quantitat de clor per bioquímica, el resultat de cada valor de suor es la mitja dels valors de clor obtinguts per la determinació bioquímica per la tècnica de conductància.

5.4.2.2 Estudi genètic: A tots els pacients se'ls hi va practicar un estudi genètic complet que inclou l'anàlisi de les regions codificants i annexes del gen *CFTR* mitjançant les tècniques de DGGE i SSA, amb un nivell de detecció del 97% en la població de Fibrosi Quística espanyola. S'estudien també els marcadors intragènics IVS8-6 (T), IVS8CA i IVS17Bta.

#### 5.4.2.3 Prova de la diferència de potencial nasal basal

La DPN es va determinar, a les dues narines, es va utilitzar el dispositiu Tholy –Medicap, amb elèctrodes de plata/clorur de plata com a elèctrode de mesura connectat a la mucosa nasal i un elèctrode de referència (catèter de punció endovenosa) insertat al teixit subcutani de l'avant-braç, es

col·loca l'elèctrode de mesura en contacte amb la mucosa nasal sota visió directe del cornet inferior a una distància de 2 cm de la narina, gràcies a un especulum d' ORL. Després de fixar-lo i de col·locar una sonda de Foley de 8 Frenchs, s' inicia el protocol de la DPN descrit a l'apartat 1.8.4.1.

Es considera valor basal, el valor més estable, considerant-se com a tal el valor de DPN que es manté durant 3 minuts. Aquest procediment es va realitzar primer a una narina i després a l'altre. Es van realitzar un total 6 determinacions de DPN per pacient, 3 determinacions en cada narina.

#### 5.4.2.4 Prova de la diferència de potencial nasal post-irrigació de la mucosa nasal amb diferents solucions

Primer es va realitzar la determinació de la DPN basal. Es considerà com a valor basal el valor mantingut durant 3 minuts. Posteriorment es va procedir a la mesura de la DPN, després de la irrigació de la mucosa nasal amb la solució d' Amilorida. Previ a la mesura, es fa passar a través de la sonda de Foley, durant 3 minuts aquesta solució irrigant la mucosa nasal. El valor que es manté estable durant 1 minut es el valor de DPN per la solució d' Amilorida. A continuació es realitza l'estudi nasal que avalua la permeabilitat al clor per l'activació de l' AMPc. Per això s'irriga la mucosa nasal durant 3 minuts amb una solució lliure de clor; el valor que s'accepta es el valor de DPN que es manté estable durant 1 minut. A continuació es procedeix a la irrigació de la mucosa nasal amb la perfusió d'isoproterenol durant 3 minuts més, considerant-se el valor DPN el que es manté estable durant 1 minut. La velocitat de perfusió de les diferents solucions ha d'ésser de 300 ml/hora. Aquest procediment es va realitzar primer a una narina i després a l'altre calculant-se la mitjana dels resultats obtinguts entre ambdues narines. També es va realitzar la valoració visual de la corba.

Es van determinar els valors absoluts de DPN basal, per cada una de les perfusions i es varen calcular els increments dels valors de DPN per cada perfusió.

#### 5.4.3 Anàlisi estadística

Les variables qualitatives s'expressen en forma de freqüències absolutes i percentatges. Les variables quantitatives s'expressen en forma de mitjana, mediana, desviació típica i valors mínim i màxim. La comparació de les variables quantitatives entre els grups de diagnòstic es farà amb el càlcul de l' ANOVA si es compleixen les condicions d'aplicabilitat (normalitat i igualtat de variàncies). Si no es pot aplicar l' ANOVA, s'emprarà la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Per a les comparacions post-hoc s'emprarà la correcció de l'error Tipus I pel mètode de la mínima diferència significativa (MDS) en el cas de l'ANOVA i de Bonferroni en el cas no paramètric (prova de Mann-Whitney posterior a la prova de Kruskal-Wallis). Si es significativa la prova de Kruskal Wallis, es divideix el valor de la p (0.05) pel número de comparacions 2 a 2 (per tant la p es < 0.05 i a més el seu valor no es fixe doncs depen del número de comparacions fetes). La comparació de les variables qualitatives es farà amb la prova de la  $\chi^2$ . En totes les proves el límit de la significació estadística es fixarà en un valor de p inferior a 0.05. Per a les anàlisis estadístiques es farà servir el programa SPSS v.18.



## 5.5 Resultats

### 5.5.1 Característiques demogràfiques del grups

Hem inclòs un total de 173 pacients, repartits en 4 grups A, B, C i D. Noranta tres pacients (53.8 %) van ser homes i 80 (46.2 %) van ser dones. ( taula 11)

	<b>Freqüència</b>	<b>Percentatge</b>
<b>dóna</b>	80	46,2
<b>home</b>	93	53,8
<b>Total</b>	173	100,0

Taula 11. Dades demogràfiques de sexe

La edat mitja dels grups va ser de 47,9 anys (rangs entre 9 i 87 anys). L'anàlisi per subgrups s'especifica a la taula 12.

	<b>Mitjana</b>	<b>Desviació</b>	<b>Mediana</b>	<b>Minim</b>	<b>Màxim</b>
<b>Grup A (FQ)</b>	21,06*	7,2	22,0	9	35
<b>Grup B (BDI)</b>	53,86	18,7	54,0	15	87
<b>Grup C (Portadors)</b>	44,73	7,9	45,0	27	59
<b>Grup D (Controls)</b>	39,71	10,5	39,5	20	60

Taula 12. Dades de l'edat en anys dels grups (\*  $p < 0.05$  respecte els altres grups).

### 5.5.2 Dades analítiques dels grups

#### 5.5.2.1 Anàlisi genètic

Es va realitzar un estudi genètic complet per les mutacions de la *CFTR*. Aquest estudi genètic inclou l'anàlisi de les regions codificants i annexes del gen *CFTR*, mitjançant les tècniques de DGGE I SSA, amb un nivell de detecció del 97% en la població de FQ espanyola. S'estudien també els marcadors intragènics IVS8-6 (T), IVS8CA i IVS17Bta.

Tots els malats amb FQ eren portadors de 2 mutacions *CFTR*, cap pacient del grup D o control sa era portador de mutacions de *CFTR*, tots els pacients del grup C (portadors sans) eren portadors d'una

mutació per la *CFTR*. La taula 13 mostra les mutacions dels pacients afectes de bronquièctasis. Trenta nou de cent dotze (34,8 %) son portadors de mutacions típiques de la FQ. D'aquests trenta nou, 6 pacients son portadors de 2 mutacions dels quals tres malalts tenen 2 mutacions típiques de CFTR (2 casos G542X/D443Y i 1 cas R75Q/R75Q). Pel que fa els 3 malalts restants portadors de 2 mutacions, 1 pacient es portador heterozigot de Delta F 508 i l'intró 8, 5T a l'altre al.lé i un altre pacient es portador de 1716G/A en un al.lé i 5T en l'altre al.lé. Finalment un altre pacient es homozigot pel 5T (5T/5T).

Tipi	Freqüència
1716G/A/-	2
1716G/A/5T	2
258G/G576A/ -	1
296+3INT,V75M/-	1
406-6T>C/-	1
5T-11TG/-	1
5T-12TG-V470/-	1
5T/5T	1
5T/7T	1
5T/DF508	1
7T/7T	50
7T/9T	25
9T/9T	3
9TMV/-	1
D443Y,G576A/	1
DF508/-	9
G542X/-	1
G542X/D443Y	2
G576A+R668C/-	2
I807M/-	1
L320V/-	1
L997F/-	3
Q179K/-	1
R75Q/-	1
R75Q/R75Q	1
V754M/-	2
W1282X/-	1
<b>Total</b>	112

Taula 13: Mutacions dels malalts amb bronquièctasis

### 5.5.2.2 Prova de la suor

Les concentracions del clor a la suor es poden veure a la taula 14. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SD, mediana i valors màxim i mínim. La prova ANOVA no es va poder realitzar degut a la manca d'homogeneïtat de les variàncies entre grups. Per tant, es va usar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Per les comparacions post hoc entre parelles es va usar la prova de Mann-Whitney, controlant l'error tipus 1 amb la correcció de Bonferroni. El grup A va presentar concentracions de Clor a la suor superior a les dels altres grups que varen ser estadísticament significatives comparativament amb tots els altres grups.

Es van realitzar un total de 416 proves. Es varen fer dues mesures en 173 malalts. En 70 vegades es van haver de repetir degut a la poca quantitat de suor generada.

Els resultats es poden veure a la taula 14 i a la figura 49.

	<b>n</b>	<b>Prova suor Macroduct (mitjana <math>\pm</math> SD) (mediana; min/max)</b>	<b>Clor bioquímica (mitjana <math>\pm</math> SD) (mediana; min/max)</b>
<b>Grup A (FQ)</b>	17	104,1 $\pm$ 27.8 113,0 ; 37 / 133,5	79.4 ( $\pm$ 20.4) 80,0 ; 35 / 100
<b>Grup B(BDI)</b>	112	37.9 $\pm$ 16.3 33,5* ; 12,5 / 100.0	25.6 ( $\pm$ 15.9) 21* ; 5 / 75
<b>Grup C (Portadors)</b>	30	25.9 $\pm$ 7.6 24,5* ; 18.5 / 60	15.2 ( $\pm$ 7.1) 12* ; 7 / 35
<b>Grup D (Controls)</b>	14	27.5 $\pm$ 5.9 28,0* ; 16,5 / 37,5	29.9 ( $\pm$ 7.8) 27,5* ; 20 / 45

\*  $p < 0,0001$  en la comparació del grup respecte al grup A en la prova de Mann-Witney.

No hi varen haver diferències entre els grups B, C i D.

Taula 14. Prova de la suor per Macroduct i determinació de Clor per bioquímica

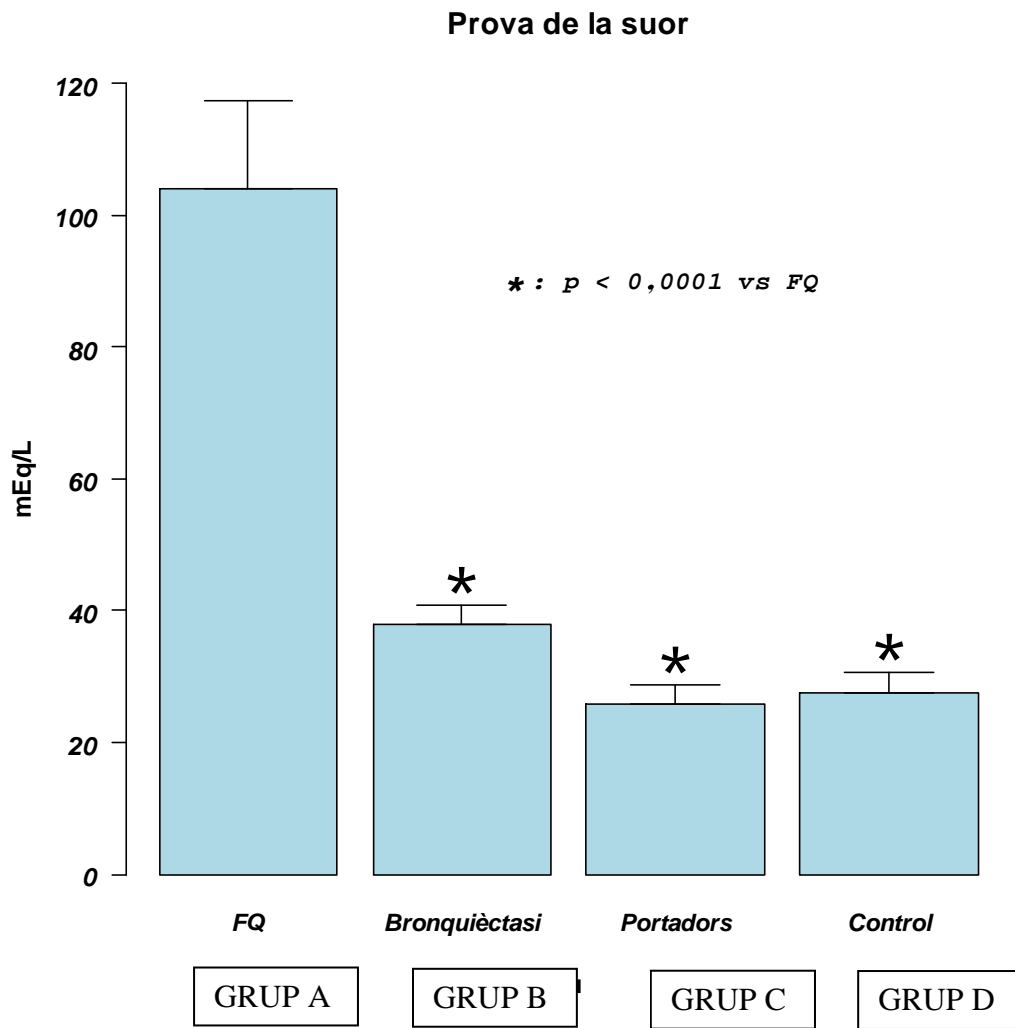


Figura 49. Prova de la suor per Macroduct dels diferents grups. EL grup A va ser estadísticament diferent ( $p < 0,0001$ ) de tots els altres grups.

□

### 5.5.3 Resultats de la diferència de potencial nasal per grups

#### 5.5.3.1 Determinacions basals

S'han obtingut 1038 mesures basals de DPN, 519 mesures en cada narina. La taula 15 i a la figura 50 mostren els valors basals de la DPN. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SD, mediana i valors màxim i mínim. La prova ANOVA no es va poder realitzar degut a la manca d'homogeneïtat de les variàncies entre grups. Per tant, es va usar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Per les comparacions post hoc entre parelles es va usar la prova de Mann-Whitney, controlant l'error tipus 1 amb la correcció de Bonferroni. El grup A (FQ) va mostrar diferències estadísticament significatives respecte als altres grups però els altres grups no tingueren diferències entre ells.

<b><i>DPN basal</i></b>	<b>Grup A (FQ) (n = 17)</b>	<b>Grup B (BDI) (n = 112)</b>	<b>Grup C (Portadors) (n = 30)</b>	<b>Grup D (Controls) (n = 14)</b>
<b><i>mitjana <math>\pm</math> SD</i></b>	-65.1 $\pm$ 11.34	-39.2 $\pm$ 17.8	-29.8 $\pm$ 10.6	-25.7 $\pm$ 6.1
<b><i>mediana</i></b>	-66.3 *	-34,0	-26,0	-24,7
<b><i>min/max</i></b>	-88,67 / -46,33	-80,0 / -7,0	-65,7 / -17,7	-33,4 / -13.0

\* p < 0,0001 entre el grup A i la resta de grups en la prova de Mann-Witney.

Taula 15 . DPN basals dels grups pre-determinats

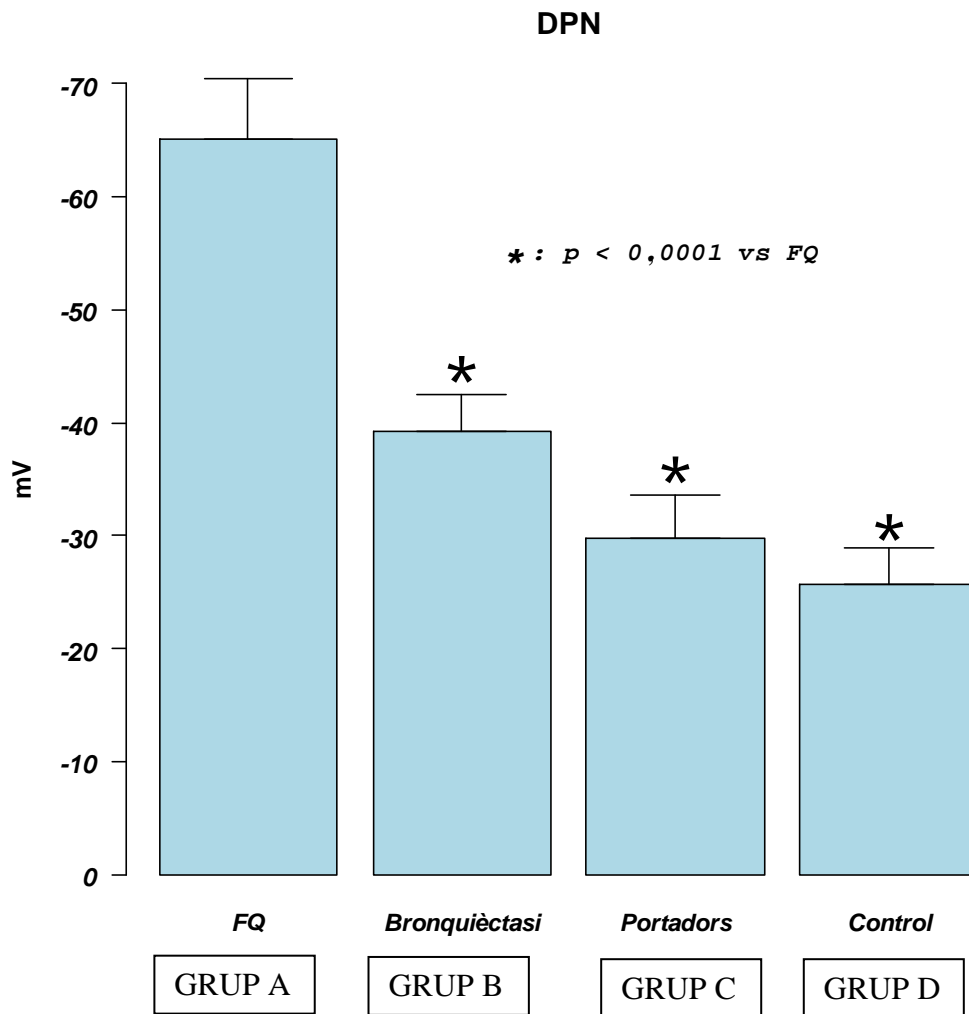


Figura 50 . Valors basals de DPN en els diferents grups. El grup A va mostrar diferències estadísticament significatives respecte als altres grups però els altres grups no tingueren diferències entre ells.

### 5.5.3.2 Irrigació amb solució d'amilorida

Aquesta i la resta de determinacions amb solucions d'irrigació nasals es varen fer en una cohort de 92 malalts. Els resultats dels valors de la mesura de la DPN després dels 3 minuts de perfusió amb la solució d' Amilorida els poden veure a la taula 16 i la figura 51. Els resultats s'expressen amb les mitjanes  $\pm$  SD, mediana i valors màxim i mínim.

La prova ANOVA no es va poder realitzar degut a la manca d'homogeneïtat de les variàncies entre grups. Per tant, es va usar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Per les comparacions post hoc entre parelles es va usar la prova de Mann-Whitney, controlant l'error tipus 1 amb la correcció de Bonferroni.

Els malats del Grup A (FQ) presenten uns valors de DPN menys negatius ( $-23.8 \text{ mV} \pm 7.8$ ) després de la perfusió amb amilorida amb un increment de  $41.3 \text{ mV} \pm 13.9$ , demostrant la resposta exagerada a l'amilorida, resposta típica de aquest grup (FQ).

Comparant els increments de DPN del grup A amb els altres tres grups, es varen observar diferències estadísticament significatives ( $p < 0.016$ ). No hi hagueren diferències entre els grups B, C i D. En aquest estadi doncs, la prova tampoc ens permet un diagnòstic etiològic diferencial en el grup de malats amb bronquièctasi no FQ.

<b><i>N total</i></b>	<b>Amilorida (mitjana <math>\pm</math> SD) (mediana ; min/max)</b>	<b><math>\Delta</math> Amilorida (mitjana <math>\pm</math> SD) (mediana ; min/max)</b>
<b><i>Grup A (n=17) (FQ)</i></b>	$-23.8 \pm 7.8$ -23,0 ; -42,0 / -10,0	$41.3 \pm 13.9$ 44,7 ; 11,3 / 65,0
<b><i>Grup B (n=56) (BDI)</i></b>	$-22,9 \pm 7,0$ -23,0 ; -48,0 / -12,0	$27,8 \pm 17,8$ 30,3* ; -6,3 / 63,3
<b><i>Grup C (n=5) (Portadors)</i></b>	$-22,4 \pm 12,1$ -18,0 ; -43,0 / -12,0	$22,6 \pm 24,7$ 27,0 ; -17,6 / 49,6
<b><i>Grup D (n=14) (CONTROLS)</i></b>	$-13,5 \pm 7,1$ -12,5 ; -32,0 / -5,0	$12,2 \pm 9,8$ 13,2** ; -4,0 / 27,3

\*  $p = 0,0049$  en la comparació dels grups respecte al grup A en la prova de Man

\*\*  $p < 0,0001$  en la comparació dels grups respecte al grup A en la prova de Man

Taula 16. Valors de la DPN després de la perfusió amb la solució d'Amilorida. Els resultats s'expressen amb les mitjes  $\pm$  SD .

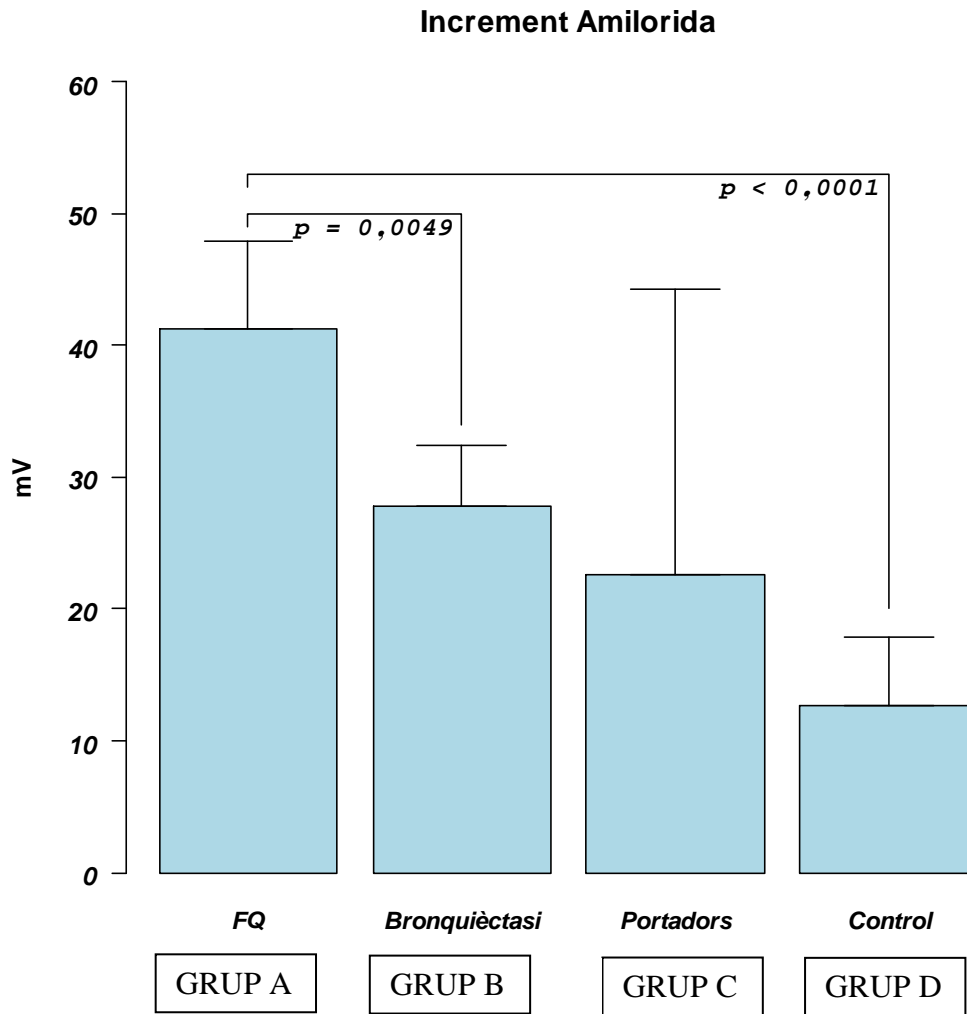


Figura 51. Increments de DPN després de la perfusió amb amilorida

### 5.5.3.3 Irrigació amb solució lliure de clor i Isoproterenol

Els resultats dels valors de la mesura de la DPN després de la irrigació de la mucosa nasal amb la solució lliure de Clor i Isoproterenol es mostren a la taula 17 i la figura 52. Els resultats s'expressen en forma de mitjanes  $\pm$  SD, mediana i valors màxim i mínim. La prova ANOVA no es va poder realitzar degut a la manca d'homogeneïtat de les variàncies entre grups. Per tant, es va usar la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis. Per les comparacions post hoc entre parelles es va usar la prova de Mann-Whitney, controlant l'error tipus 1 amb la correcció de Bonferroni.

En els malalts del Grup A (FQ), no s'observen canvis en els valors de la DPN després de la perfusió amb isoproterenol i solució lliure de Clor, respecte als resultats obtinguts amb la perfusió de la solució d'amilorida, essent l'increment d'isoproterenol pràcticament nul.



La comparació dels grups D amb el grup A i grup B varen ser estadísticament significatives (essent la p requerida < 0.016). La comparació entre els grup A i B no va ser significativa (p= ns).

Aquests resultats ens va fer replantejar la utilitat de la DPN pel diagnòstic de FQ en els malalts amb bronquièctasi, ja que no discriminava prou bé entre individus. Per obviar aquesta debilitat de la DPN, varem dividir el grup B (bronquièctasi) en 2 grups segons els valors de DPN basals de referència que varem obtenir en el primer estudi (superior / inferior de -45 mV). Aquest aspecte es desenvolupa en l'apartat següent.

<b>N total</b>	<b>ISOPROTERENOL (mitjana ± SD) (mediana ; min-max)</b>	<b>Δ Isoproterenol (mitjana ± SD) (mediana ; min-max)</b>
<b>Grup A (n=17) (FQ)</b>	-27,3 ± 8,2 -27,0 ; -45,0 / -11,0	3,5 ± 2,3 3,0 ; 1,0 / 11,0
<b>Grup B (n=56) (BDI)</b>	-29,6 ± 8,7 -29,0 ; -49,0 / -12,0	6,7 ± 7,2 5,0 ; -13,0 / 23, 0
<b>Grup C (n=5) (Portadors)</b>	-34,6 ± 12,5 -32,0 ; -49,0 / -8,0	12,2 ± 8,1 14,0 ; 2,0 / 22,0
<b>Grup D (n=14) (Controls)</b>	-28,6 ± 5,2 -2,0 ; -41,0 / -22,0	15,1± 4,8 13,5*; ** ; 9,0 / 24,0
* p < 0,0001 en la comparació del grup respecte al grup A en la prova de Mann-Witney ** p = 0,0023 en la comparació del grup respecte al grup B en la prova de Mann-Witney		

Taula 17. Valors de les mesures de la DPN i els increments després de la irrigació nasal amb una solució lliure de Clor+ Isoproterenol.

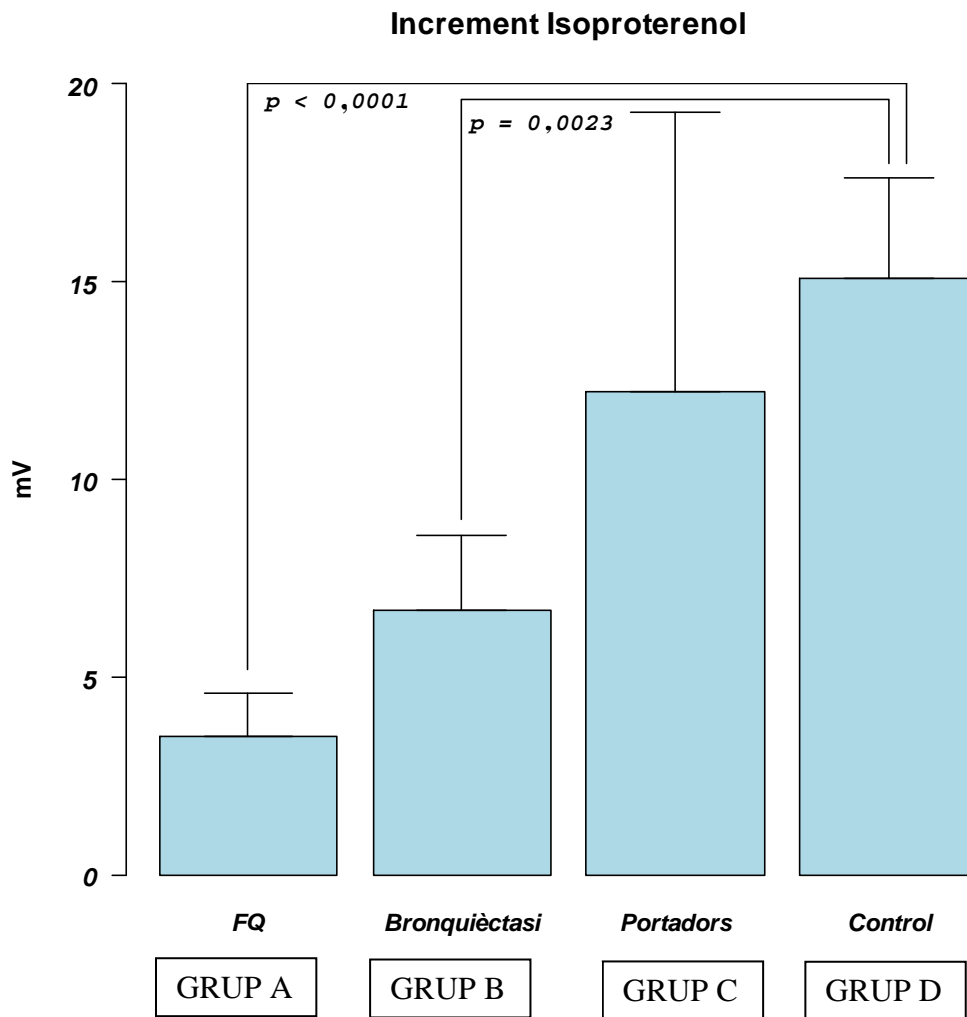


Figura 52. Increments de la DPN després de la perfusió lliure de Clor + isoproterenol  
Comparació Grup A vs B,  $p = ns$ .

5.5.4 Identificació de subpoblacions en el grup de bronquièctasi idiopàtiques en funció de la DPN basal.

5.5.4.1 Valors basals de la DPN

Varem dividir el Grup B (bronquièctasis difuses idiopàtiques) en funció del valor basal de DPN, en 2 subgrups. Es va agafar com a valor de cut-off, -45 mV. La hipòtesi va ser que els qui tenien un valor < -45 serien FQ i els altres no, de manera que es varen crear dos grups anomenats de la següent manera:

Grup Bronquièctasi difuses-FQ (BD-FQ): 37 malalts amb valors basals mitjos de la DPN < -45 mV

Grup Bronquièctasi difuses-noFQ (BD-NOFQ): 75 malalts amb els valors de basals mitjos de la DPN > -45 mV.

Els valors de les mesures del DPN basals en els malalts del grup BQ-FQ es mostren a la taula 18. Si es comparen amb els valors de les mesures de la DPN en malalts del grup A previ (FQ) veiem que son pràcticament valors superposables ( $p= NS$ ). La comparació entre l'antic grup D (controls sans) i els malalts del grup BD-FQ mostra com es d'esperar unes diferències estadísticament significatives ( $p<0.0001$ ).

Posteriorment es va procedir a comparar els valors de la DPN basal entre el grup BD-no FQ i els grups A i BD-FQ essent les diferències estadísticament significatives (taula 18 i figura 53).

	<b>Grup A (FQ)</b>	<b>BD-FQ</b>	<b>BD-NOFQ</b>	<b>Grup D (controls)</b>
<b><i>n</i></b>	17	37	75	14
<b><i>DPN Basal (mV)</i></b>	-65,1 ± 11,34	-61,2± 8,8	-28,3± 8,6	-25,7±6,1

Taula 18. Valors basals de DPN dels Grup D (Controls), Grup A (FQ), Grup BD-FQ i Grup BD-NOFQ. Els resultats s'expressen amb les mitjes ± SD. Comparacions amb la prova de Mann-Whitney: Grup A / Grup BD-FQ :  $p=0.215$  (NS). Grup A/Grup D:  $p<0.0001$ . Grup BD-FQ /Grup D : $p<0.0001$ . GrupA/Grup BD-NOFQ: $p<0.0001$ . Grup BD-FQ/Grup BD-NOFQ: $p < 0.0001$ . Grup BD-NOFQ/Grup D:  $p = 0.215$  (ns).

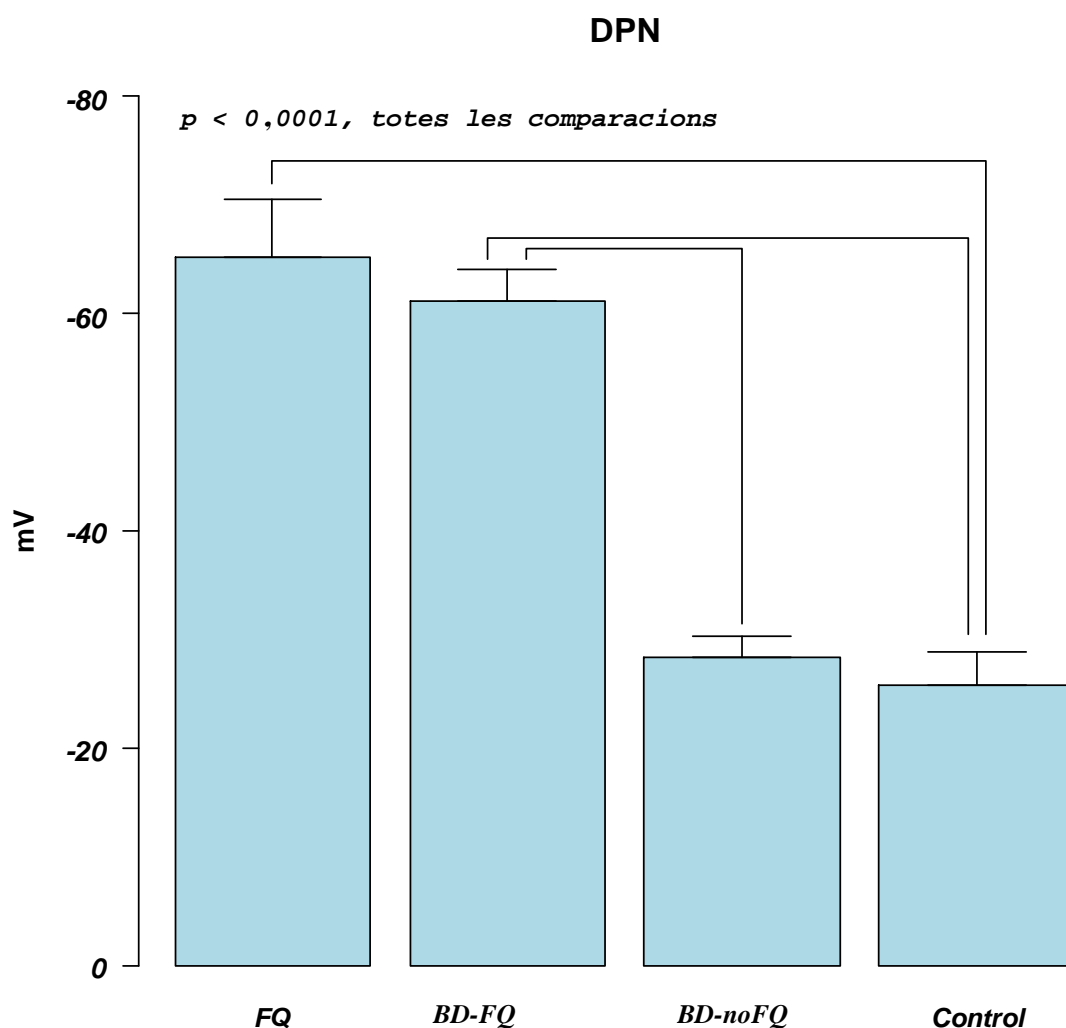


Figura 53. Valors de la DPN Basals dels Grups control, FQ, BD-FQ i BD-NOFQ

#### 5.5.4.2 Valors de DPN post irrigació amb solució d'amilorida

Després de classificar en 2 grups els malalts del grup B (bronquièctasi difuses idiopàtiques) a partir dels valors basals de DPN ( valors > -45 mV i valors < -45 mV ) en grup BD-FQ i grup BD-NOFQ, es varen repetir les determinacions dels valors de la mesura de DPN després de la perfusió amb Amilorida; aquests valors es mostren a la taula 19 i figura 54.

Els malalts BD-FQ presentaren uns valors de DPN de  $-28.5 \text{ mV} \pm 7.0$  i un increment post-amilorida de  $38.8 \text{ mV} \pm 11.0$ ; aquests resultats son estadísticament significatius comparats amb els resultats post-amilorida dels pacients del grup D (controls sans) i del grup BD-noFQ ( $p < 0.001$ ) i son superponibles ( $p=0.14$ ) comparats amb el grup A (FQ).

La mesura de DPN post-perfusió d'amilorida es per tant una prova discriminatòria per poder realitzar el diagnòstic de FQ, en malalts amb BD.

	<b>N</b>	<b>amilorida</b> <b>(mitjana ± SD)</b> <b>(mediana ; min/max)</b>	<b>Δ amilorida</b> <b>(mitjana ± SD)</b> <b>(mediana ; min/max)</b>
<b>Grup A</b> <b>(FQ)</b>	17	-23,8 ± 7,8 -23,0 ; -42 / -10	41,3* ± 13,9 44, 7; 11,3 / 65,0
<b>BD-FQ</b>	35	-22,5 ± 7,3 -23,0; -48,0 / -12,0	38,8** ± 11,0 40,0; 18,3 / 63,3
<b>BD-noFQ</b>	21	-23,4 ± 6,5 -23,0; -39,0 / -12,0	9,6 ± 10,3 8,7; -6,3 / 30,7
<b>Grup D</b> <b>(Controls)</b>	14	-13,5 ± 7,1 -12,5; -32 / -5	12,2 ± 9,8 13,2; -4,0 / 27,3

\* p < 0.0001 en la comparació contra els grups BD-noFQ i D

\*\* p < 0.0001 en la comparació contra els grups BD-noFQ i D

Taula 19. Valors de la mesura de DPN i dels increments després de la perfusió amb Amilorida, en els diferents grups.

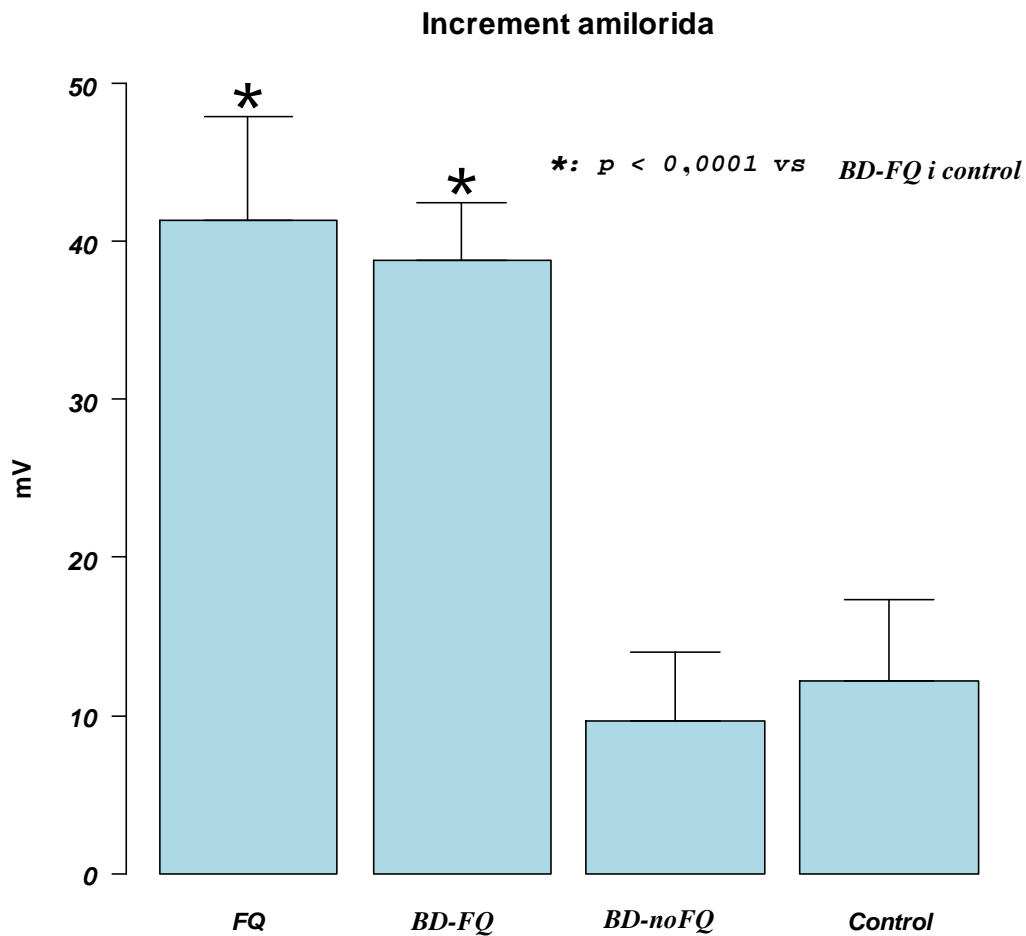


Figura 54. Valors dels increments de la DPN després de la perfusió d'amilorida en els Grups control, FQ, BD-FQ i BD-NOFQ ( $P < 0,001$ ).

#### 5.5.4.3 Irrigació amb solució lliure de Clor i amb solució d'isoproterenol

Els valors de DPN després de la perfusió nasal amb Isoproterenol en el grup BD-FQ va ser de  $-28 \text{ mV} \pm 9$ , amb un increment de  $5.6 \pm 5.7$ , superposable al del grup A (FQ). En canvi si comparem els valors obtinguts en els pacients dels Grup D, els resultats presenten una diferència estadísticament significativa.

Però al comparar el grup BD-NOFQ amb el grup A (FQ), no s'obtenen diferències clarament significatives (els valors de la  $p$  estarien en el límit de la significació), resultat que faria que el DPN basal establert de  $-45 \text{ mV}$  no fós discriminatiu per utilitzar com a cribratge pel diagnòstic de FQ en els malalts amb bronquièctasi difuses (taula 20. figura 55).

	<b>N</b>	<b>Isoproterenol (mitjana ± SD) (mediana ; min/max)</b>	<b>Δ isoproterenol (mitjana ± SD) (mediana ; min/max)</b>
<b>Grup A (FQ)</b>	17	-27,3±8,2 -27; -45,0 / -11,0	3,5±2,3 3,0; 1,0 / 11,0
<b>BD-FQ</b>	35	-28.2±7.9 -28,0; -49,0 / -13,0	5,7±5,7 4,0; -6,0 / 22,0
<b>BD-noFQ</b>	21	-32.1±9.6 -32,0; -48,0 / -12,0	8,6±8.9 10,0; -13,0 / 23,0
<b>Grup D (Control)</b>	14	-28.6±5.2 -27,0; -41,0 / -22,0	15.1±4.8 13,5; 9,0 / 24,0

Comparacions amb la prova de Mann-Whitney:

Grup A / Grup BD-FQ :  $p=0.297$  (NS, per correcció de Bonferroni) .

Grup A/Grup D:  $p<0.0001$ . Grup BD-FQ /Grup D : $p=0.000025$ .

GrupA/Grup BD-NOFQ:  $p = 0.01$

Grup BD-FQ/Grup BD-NOFQ: $p < 0.071$

Taula 20. DPN basal i després d'una perfusió lliure de Clor més isoprotrenol. Els resultats s'expressen amb mitjes i ± SD.

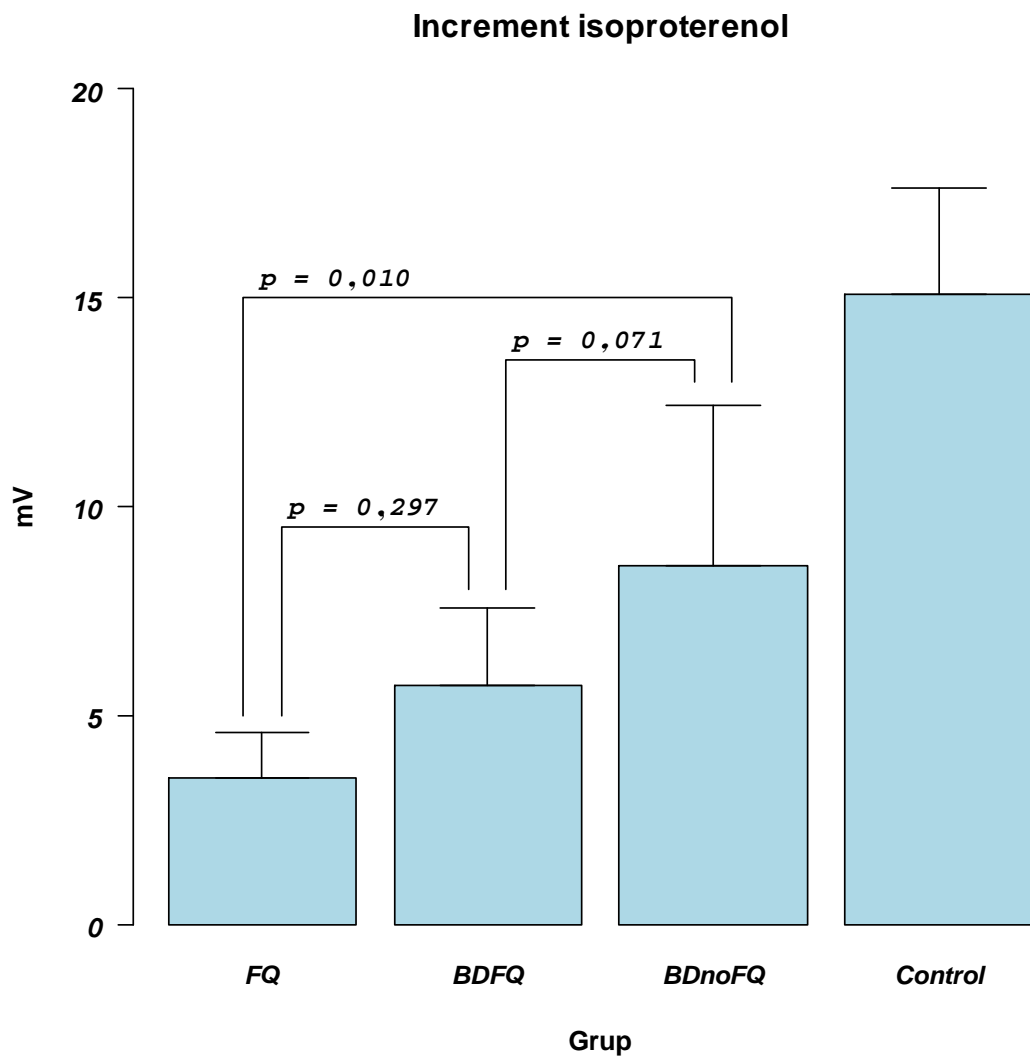


Figura 55. Gràfica dels valors de la DPN amb la perfusió Lliure de Clor i Isoproterenol  
 Comparacions amb la prova de Mann-Whitney: Grup A/Grup BD-FQ :  $p=0.297$  (NS, per correcció de Bonferroni). Grup A/Grup D:  $p<0.0001$ . Grup BD-FQ/Grup D:  $p=0.000025$ . Grup A/Grup BD-NOFQ:  $p = 0.01$ . Grup BD-FQ/Grup BD-NOFQ:  $p < 0.071$ .



Varem analitzar els pacients del total del grup B (BD-FQ i BD-NOFQ) que tenien un increment patològic d'isoproterenol. Considerant increment patològic als valors del rang d'increment d'Isoproterenol obtinguts en el grup A (malalts amb FQ coneguda, entre 1 i 11 mV).

En la figura 56 es poden observar els valors d'increment d'Isoproterenol patològics d'ambdós grups de bronquièctasi (BD-FQ i BD-noFQ). Deu pacients del grup BD-noFQ es comporten com a FQ malgrat haver presentat valors basals de la DPN > -45 mV. Vuit malalts del grup BD-FQ es comporten com no FQ. Aixó dona que 37/56 (66%) pacients del grup total de bronquièctasi son compatibles amb disfunció de la CFTR o malaltia relacionada.

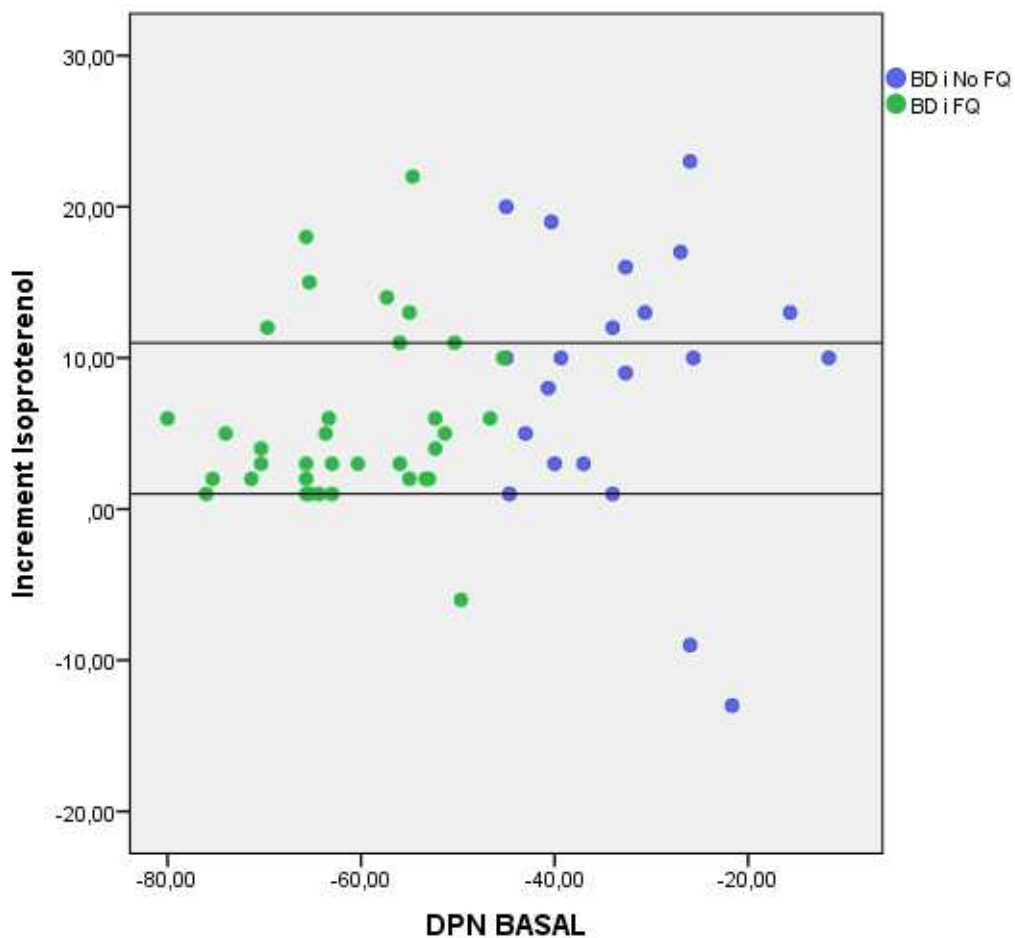


Figura 56. Valors de DPN basal i increment d' Isoproterenol en ambdós grups. S'assenyalen els valors d'increment de DPN entre 1 i 11.

#### 5.5.4.4 Mutacions *CFTR* dels malalts amb bronquièctasi difuses, prova de la suor normal i valors de la DPN patològica.

Varem estudiar les mutacions de FQ observades en els malalts amb prova de la suor normal i prova de la DPN post-irrigació amb increment d'isoproterenol patològica. Es considera, com abans, que el increment de DPN comprés en el rang 1 i 11 mV era patològic doncs es l'observat en els malalts amb FQ coneguda i diagnosticada per criteris clàssics.

Hem dit que trenta set de 56 individus amb bronquièctasi complien aquestes condicions. Les mutacions d'aquests trenta set pacients es poden veure a la taula 21; 13/37 pacients (35%) foren portadors de mutacions *CFTR*.

Varem analitzar també les variacions de l'intró 8, entre els al·lels 5T, 7T. Un pacient va resultar homozigot pel 5T (5T/5T), un altre heterozigot 5T/7T i 17 pacients homozigots 7T/7T, representant 19/37 (47%) dels pacients amb bronquièctasi amb increment patològic de la DPN post-irrigació amb isoproterenol. El 82% dels malalts amb bronquièctasi, prova de la suor normal i increment d'isoproterenol patològic son portadors d'alguna mutació compatible amb disfunció de la *CFTR*. Dels 56 pacients estudiats per bronquièctasi en aquets estudi, 37 (66%) es varen comportar com a malalts amb disfunció de la *CFTR*, i aquet grup que es va comportar bioelectricament com a FQ, el 82% dels pacients van presentar alguna alteració genètica compatible amb disfunció de la *CFTR*. El resum de les alteracions genètiques estan a la taula 21 i la descripció de les mutacions a la taula 22.

<b>TIPUS DE MUTACIÓ</b>	<b>N</b>	<b>PERCENTATGE</b>	<b>CARACTERÍSTIQUES</b>
<b><i>Mutacions establertes clàssicament</i></b>	13	35%	7 portadors; 6 amb dues mutacions
<b><i>Variacions en l'intró 8</i></b>	19	47 %	1 5T/5T; 1 5T/7T; 17 7T/7T
<b><i>Sense alteracions importants</i></b>	5	18%	

Taula 21.- Resum genètic dels pacients amb bronquièctasi difuses relacionades amb prova patològica de l'isoproterenol.

<b>Mutacions</b>	<b>Freqüència</b>
1716G/A/-	1
1716G/A/5T	1
258G/G576A	1
406-6T>C/-	1
5T/5T	1
5T/7T	1
7T/7T	17
7T/9T	4
9T/9T	1
G542X/-	1
G542X/D443Y	1
G576A+R668C	2
I807M/-	1
L320V/-	1
L997F/-	1
Q179K/-	1
R75Q/R75Q	1
<b>Total</b>	<b>37</b>

Taula 22. Mutacions dels pacients amb increment d'Isoproterenol entre 1 i -11 mV.

#### 5.5.4.5 Prova de la suor dels malalts amb bronquièctasis difuses

Si analitzem la prova de la suor dels pacients amb bronquièctasi difuses i DPN patològic (increment d'Isoproterenol entre 1- 11), podem veure que els pacients amb aquestes característiques tenen una prova de la suor amb valors més elevats encara que els valors absoluts de Cl<sup>-</sup> a la suor estiguin en un rang de valors intermedis o baixos. En canvi no es troben diferències significatives de la prova de la suor entre els 2 grups BD. La prova de la suor per tant no permet discriminar aquest grup de malalts (taula 23).

	<b>N</b>	<b>Prova suor Macroduct (mitjana ± SD) (mediana ; min/max)</b>	<b>Clor bioquímica (mitjana ± SD) (mediana ; min/max)</b>
<b>Grup A (FQ)</b>	17	104,1* ± 27,8 113,0 ; 37,0 / 133,5	79,4* ± 20,4 80,0 ; 35,0 / 100,0
<b>BD amb increment d'isoproterenol fora del rang entre 1 i 11 mV</b>	17	43,1 ± 15,9 42,5** ; 25,5 / 92,0	27,8 ± 16,8 25,0*** ; 12,0 / 75,0
<b>BD amb increment d'isoproterenol entre 1 i 11 mV</b>	39	47,9 ± 18,5 47,0** ; 17,5 / 100,0	33,9 ± 17,0 37,0*** ; 10,0 / 69,0
<b>Grup D (control)</b>	14	27,5 ± 5,9 28,0*** ; 16,5 / 37,5	29,9 ± 7,8 27,5*** ; 20,0 / 45,0

\* p < 0.0001 en la comparació del grup A respecte tots els altres grups en la prova de Mann-Witney.

\*\* p = 0.310 en la comparació entre ambdós grups BD en la prova de Mann-Witney.

\*\*\* p = 0.148 en la comparació entre ambdós grups BD en la prova de Mann-Witney

\*\*\* p > 0.0001 en comparació del grup D respecte als altres grups

Taula 23. Prova de la suor dels pacients amb FQ, Bronquièctasi difuses amb mesura de DPN patològica (increment post-irrigació amb isoproterenol entre 1 i 11 mV) i Bronquièctasi difuses amb increment d'isoproterenol fora del rang > 11 mV

5.5.4.6 Valors de referència de DPN dels malalts amb FQ i dels controls sans.

A la taula 24 poden observar els resultats de referència de la nostra cohort, tant pels malalts afectes de FQ com pels individus sans considerats com a grup control .

	<b>n</b>	<b>Basal</b>	<b>amiloride</b>	<b>Cl Lliure</b>	<b>isoproterenol</b>	<b>Δ amiloride</b>	<b>Δ isoproterenol</b>	<b>Test suor</b>
<b>Grup A (FQ)</b>	17	- 65.1* (±11.34)	-23.8 (±7.8)	-27.1 (±7.8)	-27.2 (±8.2)	+41.3** (±13.9)	+3.5*** (±2.3)	104,0**** (±27.7)
<b>Grup D (Controls)</b>	14	-25.7 (±6.1)	-13.5 (±7.1)	-27.9 (±6.7)	-28.9 (±5.2)	+12.2 (±9.8)	+15.0 (±4.8)	27.4 (±5.9)

\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* p < 0.005 en la prova de Mann-Witney.

Taula 24. Valors de referència de malalts afectes de FQ i controls sans. Els resultats es mostren en forma de mitjana ± SD.

## 5.6 Discussió

### 5.6.1 Consideracions metodològiques

Un aspecte bàsic en tot estudi que precisa d'una tècnica específica, es que la persona que realitza la tècnica la faci de manera fiable. Per tant s'ha d'haver demostrat prèviament la repetibilitat (capacitat de reproduir una tècnica de manera fiable sense variar-ne les condicions) o en alguns cassos la reproducibilitat (capacitat de reproduir una tècnica de manera fiable en condicions diferents). En el nostre cas, en l'estudi previ d'aquesta tesi, ja hem demostrat que per una banda el tècnic va fer el nombre de proves establert per les normatives internacionals per considerar-se ensinistrat i per altre banda es complien els criteris per demostrar una bona repetibilitat. Per tant, des d'un punt de vista tècnic, aquest segon estudi dut a terme compleix els criteris necessaris de fiabilitat metodològica.

### 5.6.2 Diagnòstics i classificació de la població en grups

A l'inici de l'estudi, es varen classificar els malalts en els següents grups:

- Grup A: malalts afectes de FQ clàssica, diagnosticats per la clínica i confirmat el diagnòstic per les proves de la suor i l'estudi genètic.
- Grup B: malalts afectes de bronquièctasis difuses idiopàtiques, tots ells en l'actualitat no fumadors.
- Grup C: portadors sans d'una mutació, germans o pares dels nens amb FQ.
- Grup D o control: grup d'individus sans, en els que s'exigia els següents criteris d'inclusió: no ser fumadors, no patir patologia respiratòria ni rinosinusal, Rx de tòrax i sins normals, funció pulmonar normal, 2 proves de la suor normals i estudi genètic per FQ negatiu.

### 5.6.3 Consideracions sobre la corba d'aprenentatge de la tècnica de la diferència de potencial nasal.

Per poder realitzar el diagnòstic de FQ per la determinació de la mesura de la DPN és molt important demostrar que els valors de la DPN després de la irrigació de la mucosa nasal amb les diferents solucions tenen uns valors característics que estan explicats a la taula 4. Els valors resultants de la mesura de DPN basal per un malalt de FQ es  $< -45\text{mV}$ . Després de la irrigació de la mucosa amb solució d'amilorida els valors es fan més positius obtenint uns valors pràcticament zero; lo més característic en els malalts amb FQ es l'increment de valors de DPN entre el basal i el post-Amilorida més que no pas els valors absoluts. L'increment d'amilorida que es considera patològic es  $+ 10$  aproximadament. Després de la irrigació amb la solució Lliure de Clor i Isoproterenol, en els malalts amb FQ no es produeix pràcticament cap increment en els valors de la DPN. Els valors obtinguts es poden representar gràficament en forma de corba, com es pot veure a la figura 24 diferenciant-se molt fàcilment els malalts FQ dels no FQ.

5.6.4 Interpretació de resultats de la diferència de potencial nasal: basals i post-irrigació de la mucosa nasal.

El nostre projecte es un estudi prospectiu que té com objectiu demostrar el paper de la DPN en el diagnòstic de FQ en malalts amb bronquièctasi difuses (BD) idiopàtiques amb prova de la suor normal o intermèdia, es a dir avaluar el valor discriminatiu de la DPN. Encara que la FQ es diagnostica més freqüentment durant la edat pediàtrica, les BD son una de les formes de FQ atípica que normalment es diagnostiquen a la edat adulta. La incidència de FQ es del 7.6 % entre els malalts de BD, en canvi en estudis com el de Pasteur i cols (90) basats només en la prova de la suor demostren una incidència de FQ en pacients amb bronquièctasis no filiades del 2.7%. Això es degut a que clàssicament el diagnòstic de FQ s'efectuava amb la combinació de clínica compatible i dues proves de la suor positives, però la majoria dels pacients amb BD, al igual que altres pacients amb formes no clàssiques de FQ presenten proves de la suor amb valors normals o intermedis. Per lo tant els malalts amb FQ atípica o amb formes monosimptomàtiques necessiten proves més sensibles que la prova de la suor per poderlos diagnosticar.

La majoria dels pacients amb BD diagnosticats de FQ de l'adult presenten un fenotip FQ lleu o monosimptomàtic caracteritzat per suficiència pancreàtica, mutacions lleus i malaltia pulmonar que pot tenir diferents graus de gravetat (91, 92), anant des de formes molt lleus fins a pacients amb colonització crònica per *Pseudomonas aeruginosa* i/o azoospermia obstructiva. Els últims consensos de diagnòstic de FQ en les formes atípiques aconsellen expandir el diagnòstic incloent l'estudi de les mutacions *CFTR* i la demostració "in vivo" de les propietats bioelèctriques anormals de l'epiteli nasal que presenten aquests malalts (41, 85). Una de les últimes publicacions efectuades per Bombieri et al (93) els autors recomanen que per diagnosticar les malalties relacionades amb la disfunció de la *CFTR*, en l'apartat de BD difuses, derivar a aquests malalts a un centre de FQ per intentar establir el diagnòstic de FQ atípica o malaltia relacionada amb la *CFTR* i per poder realitzar les determinacions de la diferència de potencial transepitelial.

Els estudis publicats que utilitzen la determinació de la DPN pel diagnòstic de FQ en malalts amb BD s'han dut a terme majoritàriament en adults. No existeixen valors de referència però es demostra que els pacients amb DPN anormal acostumen a tenir malaltia pulmonar més greu. D'aquí que els líders d'opinió recomanin estudiar aquests malalts mitjançant la mesura de la DPN.

En el nostre estudi hem inclòs tant població pediàtrica com adulta. Varem estudiar 173 pacients, repartits en 4 grups, Grup A: 17 pacients afectes de FQ; Grup B: 122 pacients adults afectes de BD sense diagnòstic etiològic després de seguir el protocol diagnòstic de BD proposat pel Servei de Pneumologia de l'Hospital de Sabadell; Grup C: 30 portadors sans; Grup D: 14 controls sans. Es van obtenir 1038 mesures de DPN basals permetent establir els valors de referència en els diferents grups com es pot veure a la taula 15.

El resultat de les determinacions basals de DPN no ens varen permetre realitzar el diagnòstic de FQ en els malalts del grup B (BD) tal com conclou la única publicació que utilitza en el protocol diagnòstic de BD la mesura de la DPN (93). En canvi els valors de la DPN basals mostraven una diferència molt clara entre els malalts FQ i els controls sans. Varem continuar estudiant els pacients després de la irrigació

nasal amb les diferents perfusions esmentades. Aquest pas ens va permetre determinar els valors de referència en el nostre medi dels malalts amb FQ (Taula 23) i controls sans, tant dels valors basals com dels increments obtinguts després de la irrigació amb les diferents solucions. També ens ha permès descriure el comportament d'un grup de malalts amb BD a priori no FQ.

La irrigació amb amilorida va permetre diferenciar clarament els malalts amb FQ de la resta dels grups però no va ajudar en el procés de diagnòstic etiològic del grup de malalts amb BD.

Al sotmetre als pacients a la irrigació amb Isoproterenol de nou es va poder diferenciar els malalts amb FQ de la resta. Quan ens fixàvem en el grup B (BD) no hi havia diferències estadísticament significatives quan el comparàvem amb el grup FQ. Això podia fer pensar que tots els malalts del grup B (BD) fossin FQ. Un anàlisi acurat dels resultats individualitzats va mostrar que hi havia una gran dispersió de resultats, la qual cosa podria contribuir a explicar la manca de significació estadística. Aquests resultats ens van fer replantejar l'efectivitat de la DPN en la identificació de cassos de FQ en els malalts amb bronquièctasi, donat que la DPN no ens discriminava suficient els individus del grup B. Per obviar aquest problema varem dividir el Grup B (BD) en 2 subgrups segons els valors del tall basal de la DPN a partir dels resultats que varem obtenir en el primer estudi (DPN < -45 mV). Es varen crear doncs els següents subgrups: grup BD-FQ (malalts amb bronquièctasi amb valors de DPN basals < -45mV) i grup BD-noFQ (malalts amb bronquièctasi amb DPN basals amb valors > -45mV).

Si analitzem els valors de DPN basals obtinguts amb aquests subgrups i els comparem estadísticament amb els malalts amb FQ (taula 18) observem que els valors basals de DPN dels malalts amb FQ i els del Grup BD-FQ son superposables sense haver-hi diferències estadísticament significatives; en canvi si comparem els valors basals del Grup BD-noFQ amb els valors basals del Grup A (FQ) i del Grup BD-FQ les diferències si foren estadísticament significatives. EL pas següent va ser demostrar que la determinació basal de DPN amb el tall establert ens permetia establir de manera fiable el diagnòstic de FQ sense que es perdessin cassos de FQ amb valors de DPN basal > -45 mV. S'havia de demostrar aquesta realitat de manera funcional.

Després de la perfusió nasal amb la solució d'Amilorida els pacients del Grup BD-FQ es comporten igual que els pacients del Grup A (taula 19). La DPN amb perfusió d'Amilorida però no es una prova discriminatòria per poder realitzar el diagnòstic de FQ per la següent raó: hi ha malalts que presenten BD i valors de la DPN tant basals com post-Amilorida compatibles amb disfunció de la CFTR però que la causa etiològica no es deguda a mutacions de la *CFTR* en el canal de clor sino a mutacions del canal epitelial de sodi (*ENaC*) (94). Aquest fet ens obliga a mesurar la DPN després de la irrigació amb solució lliure de Clor més Isoproterenol. Aquesta prova sí que es diferencial i patognomònica per estudiar la funció de la CFTR. Després de la mesura de la DPN amb isoproterenol, els pacients del Grup BD-FQ es varen comportar com els malalts del Grup A (FQ), però la DPN dels pacients del Grup BD-noFQ tampoc presentaven diferències clarament significatives amb els pacients del Grup A (FQ). Això doncs faria concloure que el tall de la DPN basal establert de -45 mV no és un valor discriminatiu per poder-lo utilitzar com a cribratge pel diagnòstic de FQ en els malalts amb bronquièctasi difuses. Després d'analitzar aquests resultats varem passar a estudiar els increments díisoproterenol que es trobaven en el rang FQ (de 1 a 11 mV que es el rang l'increment post-isoproterenol que presentaven

els nostres malalts de FQ). En aquest rang hi havia malalts del grup BD-FQ i malalts del grup BD-noFQ. Per poder filiar correctament un malalt amb BD com a FQ, es necessari realitzar totes les determinacions de la DPN amb totes les solucions i valorar especialment l'increment de DPN post-isoproterenol. En el cas de malalts doncs amb BDI, un increment de DPN post-irrigació amb isoproterenol entre 1 i 11mv (rang del nostre laboratori) si que ens permet establir amb fiabilitat la relació causal entre FQ i BD.

#### 5.6.5 Valoració de l'estudi genètic en els malalts amb BD

Per poder realitzar el diagnòstic de FQ en els pacients afectes de BDI els experts recomanen realitzar l'estudi del gen complet (95). En el nostre estudi, analitzant el grup BD (grup B) varem trobar que el 34,8 % (veure taula 13) eren portadors d'una o dues mutacions *CFTR*. Aquesta xifra es superior a la xifra de mutacions de la població general (25%). Ara bé, si analitzem els pacients amb BD amb prova de la suor normal o intermèdia i DPN patològic (increment de la DPN després de la irrigació nasal amb la solució d'Isoproterenol i lliure de Clor entre 1 i 11) el percentage es molt més elevat doncs un 84% (32 de 37) de pacients presenten alteracions en el gen de la *CFTR*.



## 5.7 Conclusions

- 1.- Hem determinat els valors de referència de DPN basals i després de la irrigació de la mucosa amb diverses solucions, en els malalts amb forma clàssica de FQ, en els malalts afectats de bronquièctasi difuses i en els individus sans.
- 2.- La mesura de la DPN realitzada de manera completa, pot confirmar o excloure el diagnòstic de FQ o disfunció de CFTR en malalts afectes de BD i prova de la suor no patològica.
- 3.- La mesura de la DPN basal no es útil com a prova de cribratge diagnòstic en els pacients amb bronquièctasi difuses.
- 4.- Els pacients amb bronquièctasi difuses, prova de la suor normal i DPN patològica tenen un percentatge molt elevat (82%) de mutacions *CFTR*.
- 5.- Els pacients amb BD i PDN patològica tenen mutacions més lleus que els pacients amb bronquièctasi secundàries a formes clàssiques de FQ.

## 6. DISCUSIÓ GENERAL

El diagnòstic de les malalties relacionades amb la CFTR o de les formes no clàssiques de FQ es difícil per la falta de definició del protocol diagnòstic en els algoritmes descrits en les diferents publicacions (94). En l'actualitat es discuteix la utilitat diagnòstica tant de la prova de la suor, de l'anàlisi de mutacions i de les mesures de la diferència de potencial transepitelial. Les bronquièctasis difuses idiopàtiques estan incloses en les patologies relacionades amb la disfunció de la CFTR. Les BDI quan etiologicament estan relacionades amb la disfunció de la CFTR es solen acompanyar de simptomatologia sinopulmonar i de una major freqüència de mutacions CFTR. Nosaltres també hem observat aquest fet. Mentre que en la població general hi ha un 25 % de portadors del gen de la CFTR, els malalts afectats de BDI amb prova de la suor normal i DPN patològic presenten un 37 % de mutacions típiques de la CFTR i un 45% d'alteracions a l'intró 8. Això vol dir que un 82% d'aquests malalts presenten alguna alteració en el gen de la CFTR. La varietat de mutacions CFTR que es troben en els pacients afectes de BD reflexa la naturalesa heterogènia d'aquesta entitat.

Per poder diagnosticar correctament als malalts de FQ, s'han de derivar els malalts a un centre de referència de FQ. En aquestes unitats, es podria dur a terme la determinació de la DPN per tècnics ensinistrats adequadament, ja que la determinació de la mesura de la DPN ajuda a diagnosticar les formes no clàssiques de FQ. A l'actualitat posar en marxa aquesta tècnica es relativament fàcil ja que estan publicats tant els protocols com l'estandardització de la mesura de la DPN (46,47). Lo més difícil és l'acreditació del tècnic i establir els valors de referència propis del centre.

En el primer estudi d'aquesta tesi, es varen assolir els objectius indispensables per tal de poder dur a terme el segon estudi: acreditar la formació d'un tècnic de forma fiable per realitzar la determinació de la DPN, constatar en el nostre laboratori la repetibilitat de la tècnica, determinar en el nostre medi els valors de DPN basals en els malalts afectats de FQ, portadors sans i controls i determinar els valors de DPN en un grup de pacients afectes de bronquièctasis difuses no filiades. Els resultats del primer estudi varen ser oportunament presentats en congressos internacionals (82).

El segon estudi té com objectiu demostrar la utilitat diagnòstica de la DPN en les BDI. Es van determinar les mesures de DPN basals, després de la perfusió nasal amb solució d'Amilorida, solució Lliure de Clor més Isoproterenol en els malalts amb FQ, controls sans, malalts portadors d'una mutació de la CFTR i malalts afectes de BD.

Quan varem estudiar tot el grup genèric de BD, no varem poder discriminar quins malalts eren FQ dels que no ho eren. Per tal d'arribar al diagnòstic de FQ, es va dividir el grup de BD en 2 subgrups segons el valor de DPN basal de tall que varem obtenir en el primer estudi (taula 10) en  $< -45\text{mV}$  (BQ-FQ) i  $> -45\text{mV}$  (BQ-noFQ). Quan es van analitzar els resultats de la DPN basal i després de la perfusió nasal amb les diferents solucions, els malalts BD-FQ es varen comportar com a veraders FQ però els malalts amb BD-noFQ, després de la irrigació amb isoproterenol, varen mostrar un patró similar als malalts amb FQ, de manera que no es va poder utilitzar la tècnica per establir el diagnòstic diferencial en base al valor basal de DPN ( $<$  o no a  $-45\text{ mV}$ ).

A partir d'aquí, es va intentar esbrinar si l'increment de DPN post-irrigació amb isoproterenol entre 1 i 11 mv (rang observat en els malalts diagnosticats de FQ) era el paràmetre que ens seria útil per poder diferenciar als malalts de BDI en FQ i no FQ. Els nostres resultats han demostrat que la mesura d'aquest paràmetre sí que ens permet establir el diagnòstic de FQ en malalts afectes de BDI. Aquest resultat significa que a la pràctica, s'ha de mesurar la DPN tan en situació basal com després de la irrigació de la mucosa amb les diferents solucions i que aquells casos que presenten un increment de DPN després de la irrigació amb Isoproterenol entre 1 i 11 mV poden ser diagnosticats de FQ.

Molts d'aquests malalts amb BD amb increments d'Isoproterenol patològics (entre 1 i 11 mV), tenen valors de Clor a la suor dins dels rangs de normalitat, però amb valors de Clor a la suor més elevats que els valors del grup control. A més, un percentatge molt elevat (82%) dels malalts amb BDI i increment d'isoproterenol entre 1 i 11 mV tenen a més a més mutacions del gen de la *CFTR*. Aquests dos aspectes reforcen el valor diagnòstic d'un increment de DPN post- perfusió amb isoproterenol entre 1 i 1 mV, tal com recolzen les darreres publicacions (95)

## **7. APLICACIONS CLÍNIQUES**

Del nostre estudi es deriva la següent aplicació clínica: la mesura de la DPN en malalts amb BDI i prova de la suor no patològica, ha resultat ser una prova útil per establir el diagnòstic de FQ o de malaltia relacionada amb la *CFTR*. Per aquest motiu, s'hauria d'incloure la determinació de la DPN, en l'algoritme diagnòstic de les BDI, després de realitzar la prova de la suor i abans de realitzar l'estudi genètic. Si el valor de l'increment de la DPN després de la perfusió amb isoproterenol fos  $>$  a 11 mV es podria descartar el diagnòstic de FQ i no caldria prosseguir amb l'ampliació de l'estudi genètic amb el conseqüent estalvi econòmic.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A Clínical and pathological study. *Am J Dis Child*. 1938; 56: 344-349.
- 2.- Farber S. Pancreatic function and disease in early life. V. Pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life. *Arch Pathol*. 1944;37: 238-243.
- 3.- Di Sant'Agnes PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas, its clínical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*. 1953; 12: 549-563.
- 4.- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in cystic fibrosis utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959; 23: 545-563.
- 5.- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schrumm JW, et al. Cystic fibrosis locus defined by a g enetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 1985; 23: 1054-1057.
- 6.- Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science*. 1989; 245: 1059- 1065.
- 7.- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989; 245: 1066-1073.
- 8.- Meyers BF, Lynch J, Trulock EP, Guthrie TJ, Cooper JD, Patterson GA. Lung transplantation: a decade of experience. *Ann Surg*. 1999 ; 230: 62-70.
- 9.- Knowles MR, Paradiso AM, Boucher. In vivo Nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gen Ther*. 1995;6: 445-55.
- 10.- Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies *Respir Care*. 2009; 54: 595-605.
- 11.- Pringle IA, Hyde SC, Gill DR. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 9: 991-1003.
- 12.- Wilschanski M, Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations *N Engl J Med*. 2003 9; 349: 1433-41.
- 13.- New horizons in the treatment of cystic fibrosis Cuthbert AW. *Br J Pharmacol*. 2011; 163:173-83.
- 14.- Repairing mutated proteins development of small molecules targeting defects in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Merk D, Schubert-Zsilavec M. *Expert Opin Drug Discov*. 2013; 8: 691-708. doi: 10.1517/17460441.2013.788495. Epub 2013 Apr 11.
- 15.- Dunn JM, Darrach RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 353: 1443-53.
- 16.- Garner S, Cobos N, Asensio O, Bosque M, Seculi JL. Newborn screening in Catalonia. *Ped Pulmonol*. 2003; 35 (Suppl 10): 325.
- 17.- World Health Organization. *InterNatioNal Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision*. Version for 2006.

- 18.- Verma N, Bush A, Buchdahl R. Is there still a gender gap in cystic fibrosis? *Chest*. 2005;128: 2824–2834.
- 19.- No authors listed. Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat*. 1994; 4: 167-77.
- 20.- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Riegert-Johnson DL, Korf BR, Alford RL. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*. 2004; 6: 387–391.
- 21.- Kerem B, Chiba-Falek O, Kerem E. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test*. 1997;1: 35–39.
- 22.- Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M Jr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr*. 1998; 132: 255–259.
- 23.- Casals-Senent T. El gen CFTR: Diagnóstico molecular en una población heterogénea. *An Esp Ped*. 1999; 133 (Suppl): 37.
- 24.- Asensio de la Cruz O, Bosque García M, Marco Valls MT. Cystic Fibrosis: a new adult disease. *An Esp Pediatr*. 1997; 46: 24-8.
- 25.- Gupta J, Evagelidis A, Hanrahan JW, Linsdell P. Asymmetric structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore suggested by mutagenesis of the twelfth transmembrane region. *Biochemistry*. 2001; 40: 6620-7.
- 26.- Wang W, He Z, O'Shaughnessy TJ, Rux J, Reenstra WW. Domain-domain associations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282: 1170-80.
- 27.- Alberti S, Böhse K, Arndt V, Schmitz A, Höhfeld J. The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 4003-10.
- 28.- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J et al. Defective intracellular traffic and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 1990; 63: 827-834.
- 29.- The Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. Accessed March 20, 2012.
- 30.- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 2674-89.
- 31.- Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med*. 2007; 28: 279-288.
- 32.- Long FR, Williams RS, Castile RG. Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2004;144:154–161.
- 33.- Dray X, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Dusser D, Marteau P, Hubert D. Distal intestinal obstruction syndrome in adults with cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2:498–503.
- 34.- Bronstein MN, Sokol RJ, Abman SH, Chatfield BA, Hammond KB, Hambidge KM, Stall CD, Accurso FJ. Pancreatic insufficiency, growth, and nutrition in infants identified by newborn screening as having cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1992;120: 533–540.

- 35.- De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E. Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. *Pediatrics*. 2005; 115: e463–e469.
- 36.- Langg S. Diabetes mellitus in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996; 8: 744–747.
- 37.- Koch C, Rainisio M, Madessani U, Harms HK, Hodson ME, Mastella G, McKenzie SG, Navarro J, Strandvik B. Presence of cystic fibrosis-related diabetes mellitus is tightly linked to poor lung function in patients with cystic fibrosis: data from the European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 32: 343–350.
- 38.- Milla CE, Billings J, Moran A. Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care*. 2005; 28:2141–2144.
- 39.- Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Giménez J, Segura A, et al. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod*. 2000; 15: 1476-1483.
- 40.- Gilljam M, Antoniou M, Shin J, Dupuis A, Corey M, Tullis DE. Pregnancy in cystic fibrosis. Fetal and maternal outcome. *Chest*. 2000; 118: 85–91.
41. Rosenstein BJ, Cutting GR: The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998, 132: 589–595.
- 42.- Legrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr*. 1996; 129: 892–897.
- 43.-Legrys, VA.; Rosenstein, BJ.; Doumas, BT., et al. Sweat testing: sample collection and quantitative analysis; approved guideline [Document C34-A2]. PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2000.
- 44.- Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1996; 97: 524–528.
- 45.- Knowles MR, Carson JL, Collier AM, Gatzky JT, Boucher RC. Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am Rev Respir Dis*. 1981; 124 : 484-90.
- 46.- Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M. Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *J Cyst Fibros*. 2004; 3 (suppl 2): 151–155.
- 47.-Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J,. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol*. 2004; 37: 385–392.
- 48.- Mutesa L, Azad AK, Verhaeghe C, Segers K, Vanbellinghen JF, Ngendahayo L. Genetic analysis of Rwandan patients with cystic fibrosis-like symptoms: identification of novel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel gene variants. *Chest*. 2009 ;135: 1233-42.
- 49.- Sloane PA, Shastry S, Wilhelm A, Courville C, Tang LP, Backer K A pharmacologic approach to acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease. *PLoS One*. 2012;7: e39809. Epub 2012 Jun 29.
- 50.- Richards CS, Bradley LA, Amos J, Allitto B, Grody WW, Maddalena A. Standards and guidelines for CFTR mutation testing. *Genet Med*. 2002; 4: 379–391.

- 51.-Marchand E, Verellen-Dumoulin C, Mairesse M, et al.: Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*. 2001; 119: 762–767.
- 52.- Borowitz D Evidence for the diagnosis of pancreatic insufficiency. *Pediatr Pulmonol*. 2000; 29: 167-8.
- 53.- Grody WW. Cystic fibrosis: molecular diagnosis, population screening, and public policy. *Arch Pathol Lab Med*. 1999; 123: 1041–1046.
54. Lagoe E, Labella S, Arnold G, Rowley PT. Cystic fibrosis newborn screening: a pilot study to maximize carrier screening. *Genet Test*. 2005; 9: 255–260.
- 55.- Garner S, Cobos N, Asensio O, Bosque M, Seculi JL. Newborn screening in Catalonia. *Ped Pulmonol*. 2003; 35 Suppl 10: 325.
- 56.- Ghose I, Mason GC, Martinez D, et al. Hyperechogenic fetal bowel: a prospective analysis of sixty consecutive cases. *BJOG* 2000; 107: 426–429.
- 57.- Mickle JE, Cutting GR. Clínic implications of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations. *Clin Chest Med*. 1998; 19: 443–458.
- 58.- Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med*. 2002; 347: 401–407.
- 59.- Knowles MR, Durie PR: What is cystic fibrosis? *N Engl J Med* 2002; 347: 439–442.
- 60.- Kiesewetter S, Macek M Jr, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C. : A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet*. 1993; 5: 274–278.
- 61.- Strausbaugh SD. Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology *Clin Chest Med*. 2007; 28: 279-288.
- 62.- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR. Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report *J Pediatr*. 2008;153: S4-S14.
- 63.- Castellani C, Bonizzato A, Pradal U, Filicori M, Foresta C, La Sala GB. Evidence of mild respiratory disease in men with congenital absence of the vas deferens. *Respir Med*. 1999; 93: 869–875.
- 64.- Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui LC, Durie P.. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1857–1864.
- 65.- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*. 1998; 339: 653–658.
- 66.- Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med*. 1998; 339: 645-652.
- 67.- Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, Strandvik B, McKenzie SG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. *Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Eur Respir J*. 2000; 16: 464–471
- 68.- Raman V, Clary R, Siegrist KL, et al.: Increased prevalence of mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in children with chronic rhinosinusitis. *Pediatrics*. 2002; 109:E13.

- 69.- Pasteur MC, Bilton D, Hill AT. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis on behalf of the British Thoracic Society Bronchiectasis (non-CF) Guideline Group. *Thorax*. 2010; 65: 1-58.
- 70.- Girodon E, Cazeneuve C, Lebargy F, Chinet T, Costes B, Ghanem N. CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet*. 1997; 5: 149–155.
- 71.- Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gilè LS, Luisetti M, Pignatti PF. Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet*. 1998; 103: 708–712.
- 72.- Tzetis M, Efthymiadou A, Strofalis S, Psychou P, Dimakou A, Pouliou E, Doudounakis S, Kanavakis E. CFTR gene mutations including three novel nucleotide substitutions and haplotype background in patients with asthma, disseminated bronchiectasis and chronic obstructive pulmonary disease. *Hum Genet*. 2001; 108: 216–221.
- 73.- Casals T, De-Gracia J, Gallego M, Dorca J, Rodriguez Sanchon B. Bronchiectasis in adult patients: an expression in heterozygosity for CFTR mutations? *Clin Gen*. 2004; 65 :490-495.
- 74.- Southern KW. Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease. *Respiration*. 2007; 74: 241-51.
- 75.- Alton EW, Currie D, Logan-Sinclair R, Warner JO, Hodson ME, Geddes DM. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 1990; 3: 922-926.
- 76.- Höfmann T, Bohmer O, Hüls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmüller V. Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1908-1913.
- 77.- Schüler D, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Ballmann M, Dechaux M, Edelman A. Basic protocol for transepithelial potential difference measurements *J Cyst Fibros*. 2004; 3: 151-156.
- 78.- Solomon GM, Konstan MW, Wilschanski M, Billings J, Sermet-Gaudelus I, Accurso F. An international randomized multicenter comparison of nasal potential difference techniques. *Chest*. 2010; 138 :919-28.
- 79.- Boyle MP, Diener-West M, Milgram L, Knowles M, Foy C, Zeitlin P, Standaert T. Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network Nasal PD Study Group. A multicenter study of the effect of solutions temperature on nasal potential difference measurements. *Chest*. 2003; 124: 482-489.
- 80.- Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L. Reproducibility of Nasal Potential Difference Measurements in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2007; 132: 1219-1226.
- 81.- Hofmann T, Böhmer O, Hüls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmüller V. Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1908-1913.
- 82.- Domingo-Ribas C, Bosque-García M. Nasal potential difference test to diagnose cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol*. 2006; 42: 33-8.
- 83.- Senar JC. Las mediciones de la repetibilidad y el error de medida. *Etologia* 1999; 17:53-64.



- 84.- Aplicación Metrológica de los Estudios R&R [en línea]. Ciudad de México: Metas.com, 2008 [consultado 23 de mayo de 2014, disponible en : <http://www.metas.com.mx/guiametasILa-Guia-Metas-03-11-r-R.pdf>.
- 85.- Hubert D, Fajac I, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Ellaffi M, Dall'Ava-Santucci J, Dusser D. Diagnosis of cystic fibrosis in adults with diffuse bronchiectasis. *J Cyst Fibros*. 2004 ; 3: Aug;3 (3):203.
- 86.- Wilschanski, M, Famini, H, Strauss-Liviatan N. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2001; 17: 1208-1215.
- 87.- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006; 61: 627-635.
- 88.- Kerem E, Rave-Harel N, Augarten A, Madgar I, Nissim-Rafinia M, Yahav Y. A cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variant with partial penetrance associated with variable cystic fibrosis presentations. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1914-1920.
- 89.- Stewart B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray PB Jr. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151: 899-903.
- 90.- Pasteur MC, Helliwell SM, Houghton SJ, Webb SC, Foweraker JE, Coulden RA. An investigation into causative factors in patients with bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ;162 :1277-84.
- 91.- Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med*. 1994 13; 331: 974-80.
- 92.- Strong TV, Smit LS, Turpin SV, Cole JL, Hon CT, Markiewicz D. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Engl J Med*. 1991 5; 325: 1630-4.
- 93.- Fajac I, Viel M, Gaitch N, Hubert D, Bienvenu T. Combination of ENaC and CFTR mutations may predispose to cystic fibrosis-like disease. *Eur Respir J*. 2009; 34 :772-3.
- 94.-Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros*. 2011 ;10 (Suppl 2) :S86-10295.
- 95.- Ooi CY, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Martin S, Ray PN, Steele L. Does extensive genotyping and nasal potential difference testing clarify the diagnosis of cystic fibrosis among patients with single-organ manifestations of cystic fibrosis?. *Thorax*. 2014; 69: 254-60.

## 9 ABREVIATURES I UNITATS

- FQ: Fibròsi Quística
- CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
- DPN: Diferència de potencial nasal
- OMS : Organització Mundial de la Salut
- DP: Diferència de potencial
- DPT: Diferència de potencial transepitelial
- NBD : Nucleotide-binding domain
- Cl : Clor
- Na :Sodi
- Ca: Calci
- ENaC: canals eptelials de sodi
- mV: milivolts
- ACCD :Absència congètica dels conductes deferents
- DIOS: Síndrome d'obstrucció intestinal distal
- IP: Insuficiència pancreàtica
- TIR :Tripsina immunorreactiva
- ABPA: Aspergilosi broncopulmonar al.lèrgica
- BD: Bronquièctasis Difuses
- BDI:Bronquièctasis Difuses Idiopàtiques
- TAC : Tomografia computuritzada
- TACHR:TAC d'alta Resolució
- BDFQ :Bronquiectàsics Difuses Fibròtics Quistics
- BDnoFQ: Bronquièctasis Difuses no Fibròtics Quistics
- $\Delta$  amilorida: increment de DPN post irrigació amb amilorida
- $\Delta$  Isoproterenol: increment de DPN post irrigació amb solució lliure Clor+isoproterenol
- SD : Desviació standart
- ICC: Coeficient de correlació interclasse
- VPP: Valor Predictiu Positiu
- VPN: Valor Predictiu Negatiu
- Pa: Pseudomonas aureginosa

## 10 ANNEXES

### 10.1 Informe del CEIC



#### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Doña COLOMA MORENO QUIROGA, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la CORPORACIÓ SANITÀRIA PARC TAULÍ DE SABADELL (Barcelona)

#### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor BECA CIR/ FUCAP código CIR2000/07 para que se realice el estudio titulado: "Valor diagnòstic i pronòstic del potencial diferencial nasal en la fibrosi quística " del protocolo y considera que:

1. Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsible para el sujeto.
2. La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
3. Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudiera derivarse de su participación en el estudio.
4. El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
5. Y que el Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el Corporació Sanitària Parc Taulí de SABADELL por DOMINGO RIBAS CHRISTIAN, como investigador principal.

Lo que firma en SABADELL a jueves, 14 abril 2011

Firmado:



**Dra. Coloma Moreno Quiroga**

Ref.: 1999027

## 10.2 Finançament



Lluís Blanch Torra, director de Recerca i Innovació de la Corporació Sanitària Parc Taulí i director de l'Institut Universitari Parc Taulí (UAB),

### FAIG CONSTAR:

Que Montserrat Bosque García ha obtingut un ajut en la 2a Convocatòria de les Beques Taulí de Recerca de la CSPT, amb el projecte titulat: *Valor diagnòstic i pronòstic del potencial diferencial nasal en la fibrosi quística.*

Que la quantitat atorgada al projecte ha estat de 500.000 pts.

I perquè consti, signo aquest document.

Parc Taulí, 1  
08208 Sabadell - Barcelona (Spain)  
Telefon: +34 937 236 673  
Fax: +34 937 175 067



Sabadell, 14 de desembre de 2000

## 10.3 Taules de resultats

### 10.3 Taules de resultats

IdHClínica	Edad	Sexo	Estudi genético	Diagnostico2	Test del sudor_1	Test del sudor_2	Na_Cl	PDN_1	PDN_2	PDN_3	Amiloride	ISOprotenol	Cl	Posit-Negat	Diagnostico
031950	40	0	7T/7T	2	35	23		40	57	52	19	13	12		NO-FQ
084394	33	0	delta F/delta F	1	120	115	100	52	40	65	18	23	21	Positivo	FQ
084497	25	1	7T/9T	2	67	55	75	21	23	19					NO-FQ
084942	25	0	7T/7T	2	27	28	13	64	20	18					NO-FQ
085365	27	0	7T/7T	2	60	49	34	34	23	21	24	15	13	Negativo	NO-FQ
089438	26	1	3849+1G>A/9TM/V	1	70	82	75	56	45	47	22	27	25	Positivo	FQ
092047	34	1	I507D/-	3	23	28	12	36	23	26					NO-FQ
093418	29	0	DF508/-	2	12	21	12	32	17	12					NO-FQ
096902	32	1	7T/7T	2	29	28	12	26	28	32					NO-FQ
100601	31	1	5T/5T	2	59	56	58	47	69	74	23	29	22	Positivo	FQ
117331	28	1	7T/9T	2	29	29	23	35	22	24					NO-FQ
118606	29	0	DF508/DF508	1	120	110	100	77	78	76	20	25	22	Positivo	FQ
118659	71	1	7T/9T	2	34,00	32	23	25	7	25					NO-FQ
132356	22	0	DELTA F508/1812-1G-A	1	138	129	79	62	75	72	23	24	22		FQ
135401	22	0	1811+1,6KBA>G/Q 1100P	1	130	123	87	54	68	75	25	27	28		FQ
142155	34	1	DF508/-	2	23	25	12	37	20	22					NO-FQ
142528	22	1	5T/DF508	2	87	97	75	51	54	67	15	29	28		FQ
147052	21	1	7T/7T	2	34	42	44	20	7	37					NO-FQ
148667	20	0	DF508/R709X	1	124	112	78	60	75	68	23	34	38		FQ
151253	37	1	R75Q/-	3	23	21	12	20	17	23					NO-FQ
152273	23	0	9TMV/-	2	34	23	7	23	21	15					
153328	31	1	7T/7T	2	39	32	23	20	27	35					NO-FQ
155226	30	0	DF508/-	2	25	28	11	10	28	22					NO-FQ
156078	20	0	DF508/DF508	1	126	98	100	73	48	65	12	15	17	Positivo	FQ
156497	25	1	DF508/DF508	1	120	102	98	75	76	74	10	11	17	Positivo	FQ
157536	31	1	DF508/-	2	45	37	24	15	24	18					NO-FQ
163464	24	1	DF598/-	2	38	31	12	17	21	18					NO-FQ
164300	22	0	L997F/DF508	1	116	110	56	55	53	52	42	45	46	Positivo	FQ
164308	22	1	1811+1,6KBA>G/Q 1100P	1	135	120	80	76	65	58	18	20	22		FQ
166236	19	0	5T/7T	2	45	47	23	36	47	19	28	29	31	Positivo	FQ
166462	22	0	DF508/-	2	35	45	12	68	52	45	21	34	40	Negativo	NO-FQ
204685	42	0	DF508/-	3	21	23	12	22	23						NO-FQ
208013	35	0	G542X/D443Y	2	45	67	57	67	75	72	26	28	29		FQ
213119	58	1	7T-16-32/7T-16-	2	43	45	32	54	64	75	24	25	27	Positivo	FQ
213700	75	1	L997F/-	2	23	28	12	30	19	16	25	12	13	Negativo	no fq
219464	35	1	Y1014C/-	3	21	16	10	20	29	21					NO-FQ
223873	73	1	9T/7T	2	38	32	15	48	44	43	23	43	45	Negativo	NO-FQ
224799	71	0	7T/7T	2	47	54	44	30	32	60	29	37	39	Negativo	NO-FQ
227389	69	0	I807M/-	2	60	56	56	65	56	76	15	18	16	Positivo	FQ
230255	57	1	DF508/-	3	18	23	15	20	20	26					NO-FQ
232122	50	1	L320V/-	2	58	98	58	59	60	72	19	24	20	Positivo	FQ
233614	41	0	DF508/-	3	25	23	12	22	29	24					NO-FQ
236529	45	1	L997F/-	3	23	21	12	25	28	24					NO-FQ
243557	70	1	7T/7T	2	34	32	12	20	40	38	32	48	45		NO-FQ

IdHClínica	Edad	Sexo	Estudi genético	Diagnostico2	Test del sudor_1	Test del sudor_2	Na_Cl	PDN_1	PDN_2	PDN_3	Amiloride	ISOprotenol	Cl	Posit-Negat	Diagnostico
244504	53	1	N1303K/-	3	23	27	12	26	27	24					NO-FQ
247579	67	0	7T/7T	2	17,00	18	45	98	75	67	23	29	25		FQ
247757	49	0	1716G/A7-	3	23,00	26	28	64	37	28					NOFQ
249310	53	0	A1006E/-	3	32,00	32	30	25	20	23					NO-FQ
250607	75	0	7T79T	2	32	23	15	22	20	50	22	35	34	Negativo	NO-FQ
251860	76	0	G576A+R668C	2	45	54	34	55	60	74	18	19	18	Positivo	FQ
257121	57	0	7T/9T	2	27	32	15	25	23	37					NO-FQ
257132	66	0	G576A+R668C	2	47	52	45	62	65	84	23	27	25	Positivo	FQ
257280	52	1	7T/9T	2	56	67	15	23	24	22					NO-FQ
258734	52	1	7T/9T	2	23	35	39	77	23	19					NO-FQ
267118	70	0	9T/7T	2	23	28	14	70	63	76	14	26	31	Negativo	NO-FQ
267360	50	0	406-6T>C/-	2	25	43	10	30	30	60	23	26	24		FQ
268011	27	1	DF 508/-	3	23	28	12	22	28	26	43	49	50		NO-FQ
274579	77	0	9T/9T	2	45	59	40	65	98	59	23	28	25	Positivo	FQ
276392	73	1	W1282X/-	2	49	45	34	60	62	75	21	39	41	Positivo	FQ
276709	47	1	7T/7T	2	38	37	23	50	19	29	23	32	34	Negativo	NO-FQ
282149	59	0	389+1G>A/-	3	21	18	9	23	28	32					NO-FQ
288413	52	1	Q1100P/-	3	23,00	45	25	43	38	12					NO FQ
299711	61	1	9T/7T	2	21	34	17	9	21	27					NO-FQ
302471	75	0	7T/7T	2	32	35	12	40	22	35					NO-FQ
303776	54	1	7T/9T	2	18	34	12	20	12	23					NO-FQ
306434	48	1	7T/7T	2	23	27	19	16	18	15					NO-FQ
311537	64	1	7T/9T	2	56	45	43	9	14	55	12	35	38	Negativo	NO-FQ
312129	45	1	7T/7T	2	23	21	15	70	12	20					NO-FQ
318264	80	0	7T77T	2	24	21	13	45	23	61	39	44	42	Negativo	NO-FQ
321174	82	0	296+31NT.V75M	2	47	53	31	8	18	21	20	33	31	Negativo	NO-FQ
326139	65	1	9T/7T	2	38	35	33	44	37	32					NO-FQ
327038	72	1	7T/7T	2	23	29	12	32	32	24					NO-FQ
330519	47	1	R709X/-	3	28	27	12	29	20	23					NO-FQ
337672	53	0	7T/7T	2	93	67	42	35	54	70	23	25	26		FQ
340607	49	0	9T/7T	2	48	53	28	60	22	82	12	34	36	Negativo	NO-FQ
347482	87	0	7T/7T	2	23	26	13	40	43	35	21	31	33	Negativo	NO-FQ
347544	63	1	7T/7T	2	39	38	24	10	14	11					NO-FQ
348396	41	1	DF 508/-	3	24	15	7	20	29	16					NO-FQ
353410	63	1	1716G/A	2	23	21	23	26	22	25					NO-FQ
353514	51	0	7T/7T	2	38	35	18	57	78	61	21	36	33	Negativo	NO-FQ
359528	75	0	7T/9T	2	23,00	34	23	30	30						
359589	87	0	7T/9T	2	37	35	25	25	30	45					NO-FQ
365957	38	1	DF 508/-	3	21	24	12	20	23						NO-FQ
367208	74	0	7T/7T	2	21	19	12	28	29	19					NO-FQ
367407	55	0	G542X/-	2	65	49	42	40	33	38	29	32	40	Negativo	NO-FQ
367750	80	1	1716G/A/-	2	23	29	21	75	52	84	21	24	22	Positivo	FQ
371639	44	1	7T/7T	2	60	75	50	24	62	74	35	37	36	Positivo	FQ
377798	77	0	5T-11TG/-	2	35	39	9	25	14	21					NO-FQ

IdHClínica	Edad	Sexo	Estudi genético	Diagnostico2	Test del sudor_1	Test del sudor_2	Na_Cl	PDN_1	PDN_2	PDN_3	Amiloride	ISOprotenol	Cl	Posit-Negat	Diagnostico
379490	57	1	7T/7T	2	40	32	12	63	9	8					NO-FQ
380896	52	1	7T/7T	2	21	19	12	45	23	15					NO-FQ
384063	73	1	258G/G576A	2	35	56	45	67	56	45	25	28	27	Positivo	FQ
38446	54	1	7T/7T	2	23,00	29	16	43	32	39					NO FQ
384466	54	1	7T/7T	2	34	21	12	11	22	29					NO-FQ
396202	69	0	7T77T	2	26	28	12	31	48	23					NO-FQ
403449	73	0	9T/9T	2	23	32	23	38	27	47					NO-FQ
407294	54	0	Q179K/-	2	45	61	37	78	80	70	48	49	49		FQ
410470	70	1	7T/7T	2	35	23	28	35	35	30					NO-FQ
413531	73	1	7T/7T	2	32	21	12	41	72	23	12	22	20		NO-FQ
417358	72	1	7T/7T	2	69	59	69	35	7	35	32	42	48		NO-FQ
419310	46	0	7T/97	2	26	21	12	50	27	23					NO-FQ
420380	52	1	DF508/-	3	23	26	15	25	31	23					NO-FQ
423286	49	0	1812-1G-A/-	3	23	21	14	15	20	18					NO-FQ
423896	53	1	DF508/-	3	31	21	10	29	20	24					NO-FQ
424879	52	1	R75Q/R75Q	2	90	110	47	65	23	69	21	25	23	Positivo	FQ
426673	58	0	D443Y,G576A/	2	50	58	39	68	79	79	12	14	16	Positivo	FQ
427237	87	1	7T/9T	2	23,00	27	34	58	32	12					
433050	57	1	7T/7T	2	90	52	45	30	57	53	23	29	27	Positivo	FQ
441728	59	0	7T/9T	2	34,00	29	32	27	45	37					
446421	80	1	5T-12TG-V470/-	2	25	28	13	47	45	15					NO-FQ
449031	30	1	7T/7T	2	76	89	56	54	57	78	23	26	24	Positivo	FQ
462376	28	1	R75Q/-	2	68	32	42	27	31	23	23	40	49		NO-FQ
463484	17	1	7T/7T	2	48	37	23	30	42	30	17	29	28		NO-FQ
468188	63	1	7T/7T	2	32	45	15	63	78	56	26	27	26		FQ
481225	17	0	V754M/-	2	45	34	25	20	47	18					NO-FQ
481334	17	1	DF508/N1303K	1	100	120	85	62	51	75	34	36	35		FQ
484809	45	0	V754M/-	2	23	32	42	20	13	25					NO-FQ
499336	44	1	7T/7T	2	69	49	45	50	50	34	14	15	14	Positivo	FQ
500301	55	0	7T/7T	2	28	27	12	20	30	19					NO-FQ
520707	55	1	7T/9T	2	29	29	15	65	42	28	21	31	36	Negativo	NO-FQ
528883	56	0	N1303K/-	3	23	21	12	31	26	23					NO-FQ
539287	41	0	DELTA508 /-	3	32	23	12	78	25	23	18	32	35		NO-FQ
539967	15	0	7T/7T	2	23	15	10	8	7	6					NO-FQ
540622	32	1	7T/9T	2	26	34	21	10	24	15					NO-FQ
549982	65	0	7T/7T	2	37	34	12	52	60	45	34	40	49	Negativo	NO-FQ
550636	49	1	7T/7T	2	43	42	34	64	65	67	34	35	34	Positivo	FQ
579075	56	0	7T/7T	2	25	26	14	34	27	18					
593302	66	0	7T/7T	2	13	23	9	35	59	21					NO-FQ
593932	13	0	DF508/Y1014C	1	55	60	35	55	41	67	23	27	24		FQ
594153	65	1	7T/7T	2	43	45	38	28	28	65	20	39	37	Negativo	NO-FQ
594787	12	0	DF508/DF508	1	127	135	100	40	50	49	25	27	26		FQ
599356	45	0	L997F/-	2	45,00	49	49	57	59	65	21	24	22		FQ
605777		1	7T/7T	2	13,00	12	5	59	23	15					NOFQ

IdHClínica	Edad	Sexo	Estudi genético	Diagnostico2	Test del sudor_1	Test del sudor_2	Na_Cl	PDN_1	PDN_2	PDN_3	Amilorida	ISOprotenol	Cl	Posit-Negat	Diagnostico
611444	53	1	L997F/-	2	22	25	12	6	22	15					NO-FQ
642568	77	1	7T/7T	2	23	21	12	35	60	12					NO-FQ
647080	72	0	9T/9T	2	21	28	15	25	20	30					NO-FQ
657798	13	1	DF598/Y1014C	1	35	39	35	75	67	89	25	28	26		FQ
673736	62	0	7T/9T	2	32	45	17	60	34	74	28	39	41	Negativo	NO-FQ
692314	9	1	DF508/Y1014C	1	89	98	80	76	67	75	26	29	28		FQ
693037	40	1	7T/7T	2	23	21	11	60	47	58	17	19	16	Positivo	FQ
701521	51	1	7T/7T	2	45	37	19	35	60	56	28	39	40	Negativo	NO-FQ
701522	71	1	9T/7T	2	32	35	9	19	29	28					NO-FQ
707377	42	1	DF508/-	3	23	25	13	50	51	25	12	29	28		NO-FQ
708115	46	0	DF508/-	3	24	21	12	29	25	29					NO-FQ
709703	39	0	1716G/A/5T	2	32	34	15	60	56	81	15	17	16		FQ
724782	18	0	DF508/DF508	1	120	121	85	87	97	82	35	39	37		FQ
729003	36	1	DF508/-	3	23	21	12	81	60	56	16	18	17	Positivo	FQ
750660	40	0	7T/9T	2	32	25	12	13	10	12	15	25	27	Negativo	NO-FQ
755607	36	0	DF508/-	3	24	25	9	26	39	21					NO-FQ
758115	52	0	DF508/-	3	59	61	35	45	52	53	23	45	53	Positivo	NO FQ
758118	37	1	1716G/A /-	3	26,00	31	26	42							
758570	45	1	Y1014C/-	3	28,00	23	27	35	34						
761207	43	0	7T/7T	2	32,00	36	36	58	75						
768844	48	1	DF508/-	3	23	31	12	28	18	15					NO-FQ
768846	76	0	7T/7T	2	34	29	22	28	44	21					NO-FQ
774627	39	1	DF508/-	3	35,00	36	15	50	25						
797838	54	0	7T/7T	2	35,00	31	16	75	27						
808865	35	0	7T/7T	2	21	25	12	30	20	27					NO-FQ
85682	46	0	7T/9T	2	40	56	23	51	58	45	25	30	28	Positivo	FQ
999999	35	1	DF508/D924N	1	65	75	78	69	72	60	23	27	26		FQ
ANGELE	34	0	7T/7T	4	23	20	25	25	24	25	12	25	24		
CONTRO	20	0	7T/7T	4	20	20	20	20	20	20	17	27	28		
LAURA	34	1	7T/9T	4	23,00	21	26	40	39	21	11	25	29		
MAITE	45	1	7T/9T	4	29,00	31	34	38	34	23	13	33	36		
MONTSE	40	1	7T/7T	4	34,00	21	34	12	15	12	17	35	32		
PEPI	43	0	7T/9T	4	28,00	26	23	27	12	25	18	31	29		
RESI	60	1	7T/7T	4	27,00	32	43	28	37	34	32	41	40		
SUSA	56	1	9T/9T	4	28,00	36	38	24	22	27	6	22	27		
TERESA	29	0	7T/7T	4	29,00	28	29	27	15	23	8	32	31		
VALDE	39	1	9T/7T	4	35,00	40	45	20	49	31	6	25	35		
XAVI	45	1	7T/7T	4	25,00	28	31	28	34	32	5	27	15		
helena	43	1	7T/7T	4	37,00	35	23	18	26	23	19	28	21		
JORDI	29	0	7T/7T	4	26,00	34	26	26	27	22	14	27	23		
ALBA	39	1	9T/7T	4	21,00	12	22	25	21	28	11	23	21		



