



CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ

**AVALIAÇÃO DAS CORRENTES CONTÍNUAS, PULSADA
E CONSTANTE, PELO MÉTODO DE IONTOFORESE
POR PILOCARPINA EM INDIVÍDUOS COM E SEM
FIBROSE CÍSTICA.**

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ

**AVALIAÇÃO DAS CORRENTES CONTÍNUAS, PULSADA
E CONSTANTE, PELO MÉTODO DE IONTOFORESE
POR PILOCARPINA EM INDIVÍDUOS COM E SEM
FIBROSE CÍSTICA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: José Dirceu Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Ubaldo Vieira Junior

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ E
ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ DIRCEU
RIBEIRO

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas
2014

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

So89a Souza Gomez, Carla Cristina, 1985-
Avaliação das correntes contínuas, constante e pulsada, pelo método de iontoforese por pilocarpina em indivíduos com e sem fibrose cística / Carla Cristina Souza Gomez. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : José Dirceu Ribeiro.
Coorientador : Francisco Ubaldo Vieira Junior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cloro. 2. Diagnóstico. 3. Glândulas sudoríparas. 4. Suor. 5. Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística. I. Ribeiro, José Dirceu, 1952-. II. Vieira Junior, Francisco Ubaldo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of direct constant and direct pulsed currents by pilocarpine iontophoresis in cystic fibrosis and healthy individuals

Palavras-chave em inglês:

Chloride

Diagnosis

Sweat glands

Sweat

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

José Dirceu Ribeiro [Orientador]

Fabiola Villac Adde

Marisa Isabel Lopes de Sousa

Data de defesa: 20-08-2014

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

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ

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

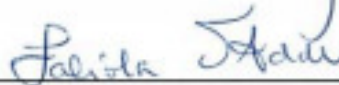
Coorientador (a) PROF(A). DR(A). FRANCISCO UBALDO VIEIRA JÚNIOR

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO



2. PROF(A). DR(A). FABÍOLA VILLAC ADDE



3. PROF(A). DR(A). MARISA ISABEL LOPES DE SOUSA



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

Data: 20 de agosto de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Suzi por ter me ensinado a confiar na minha capacidade, pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e decisões.

EPÍGRAFE

Se enxerguei mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigante.
(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar me guiando e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho, vocês foram imprescindíveis para realização e conclusão deste trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro pela orientação, por todo o seu saber, só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, conselhos, paciência e dedicação. Tenho orgulho em dizer que um dia fui sua orientada;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Francisco Ubaldo Vieira Júnior, por ter acreditado em minha capacidade em realizar este trabalho e ter dado todo o apoio e orientação necessário para o êxito desta dissertação;

À Dra. Maria de Fátima Servidoni, por sua ajuda em todas as fases deste trabalho, por acreditar no futuro deste projeto e pelo seu amor à pesquisa e aos pacientes. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho. Você é competente, dedicada e um exemplo para todos os profissionais;

À Prof^a. Dra. Maria Ângela Gonçalves O. Ribeiro, pela sua disponibilidade e interesse em me ajudar, por ser sempre solícita e prestativa. Só tenho a agradecer, pois sempre demonstrou preocupações não somente no andamento da pesquisa, mas também pela minha saúde e pela minha vida pessoal, tornando possível a realização de muitas conquistas;

Ao Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro, por me ceder seu FAEPEX para compras de insumos para a realização deste projeto, por me permitir fazer parte do seu laboratório de Fibrose Cística, pelas orientações, ensinamentos e sugestões valiosas neste projeto e também por acreditar no futuro deste trabalho;

Às professoras do aprimoramento em Fisioterapia Pediátrica, Rosângela Grande, Celize Almeida, Therezinha de Oliveira e Milena Antonelli, que me ajudaram e incentivaram principalmente no início do mestrado;

À Dra. Adriana Mendes Vinagre, bióloga responsável pelo laboratório de Fibrose Cística, por suas sugestões no desenvolvimento deste projeto. Por sempre se mostrar disponível e prestativa em ajudar a todos os alunos, por acreditar em mim, pela amizade e por fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins;

Às funcionárias Célia Pavan, Michele Rondon e Jaqueline dos laboratórios Gastrocentro e Gastropediatria, por sempre se mostrarem dispostas em contribuir com esse projeto;

Aos amigos que fiz durante o mestrado que compartilharam esses momentos de aprendizado, especialmente, Renata Okuro, Elson Gomes, Paloma Parazzi, Pricila Novaes, Renan Mauch, Gabriele Líbano, Caroline Bondarik, Lucas Moraes, Juliana Moreira e Walmir Cutrim Aragão Filho, que me ajudaram e contribuíram muito para o desenvolvimento deste projeto. Fernando Marson, por ter me ajudado imensamente na estatística deste trabalho, sem sua ajuda, sinceramente não sei como teria sido este desfecho. E à Aline Gonçalves, que nunca mediu esforços em me ajudar, nas coletas, nos orçamentos e com os artigos que enviava ao meu e-mail;

Ao físico Zaldivar Dissério Junior e ao engenheiro Paulo José Coelho Canavezi, por fazerem parte do desenvolvimento do aparelho de indução de suor deste trabalho, além da amizade e disponibilidade em responder as minhas numerosas dúvidas;

Aos Professores Fabíola Villac Adde, Marisa Isabel Lopes de Souza, Paulo Maróstica e Gabriel Hessel pela gentileza em disponibilizar tempo e conhecimento para este trabalho;

A todos meus amigos de Franca-SP, em especial: Daiane Araújo, Mirela Jacinto, Cleiton Malta, Camila Adão, Priscila Penna, Almir Resende e Karol de Brito que sempre entenderam minha ausência e vibraram com as minhas conquistas e vitórias, sabem como me amparar quando eu preciso. “Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudade, mas não estará só” (Amir Klink);

Aos voluntários, aos pacientes e seus responsáveis, por aceitarem participar desse estudo, em especial meu paciente Thiago Magalhães Gonçalves e sua família, por também terem contribuído com este trabalho e por sempre compreenderem os meus atrasos e imprevistos devido às reuniões e coletas deste trabalho;

Ao Marcelo Ota, por me apoiar, por eu poder compartilhar meu dia a dia, por entender e ter paciência quando precisei estar ausente e por estar sempre mostrando importância do meu trabalho e felicidade com minhas conquistas;

Aos meus pais Suzi e Marcos pelos ensinamentos, amor, carinho e dedicação. Em especial a minha mãe, pelo amor incondicional, pelo apoio financeiro, que mesmo com nossas dificuldades não me deixou desistir dessa jornada;

À minha irmã Daniela Almeida, ao seu modo sempre se orgulhou de mim;

Aos meus avôs Nídia e Ademar, tios, tias, primos e primas, que vibram comigo desde a aprovação na prova, e sempre “fizeram propaganda” positiva a meu respeito;

À minha madrinha Mércia Nascimento, que foi minha voluntária nesta pesquisa, pela presença constante, carinho, incentivo, conselhos e entusiasmo para o acontecimento deste trabalho.

A Márcia de Britto, secretária da PGSCA, pela colaboração;

Ao setor de audiovisual da FCM, pelas confecções dos pôsteres para os congressos;

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os funcionários do CIPED, da FCM e do HC da Unicamp, especialmente a Silvana Dalge Severino, Rosa Maria Genésio, Taís Mazola, Milton César de Souza e Antônio Salvador Pedrete Neto, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Fibrose Cística.....	1
1.2-Fisiopatologia das glândulas sudoríparas.....	5
1.3-Teste do suor.....	6
1.4-Teste do suor no Brasil.....	13
1.5-Dispositivos de iontoforese.....	14
2-JUSTIFICATIVA.....	17
3-OBJETIVO.....	18
3.1-Objetivo Geral.....	18
3.2-Objetivos Específicos.....	18
4-CASUÍSTICA E MÉTODO.....	19
4.1-Desenho do estudo.....	19
4.2-População do estudo.....	19
4.2.1-Critérios de Inclusão.....	19
4.2.1.1-Pacientes com suspeita e com fibrose cística.....	19
4.2.1.2-Indivíduos saudáveis.....	20
4.2.2-Critérios de não inclusão ou exclusão.....	20
4.3-Aspectos éticos.....	20
4.4-Métodos.....	21
4.5-Análise estatística.....	27
5-RESULTADOS.....	29
6-DISCUSSÃO.....	43
7-CONCLUSÃO.....	52
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
9-ANEXOS.....	61
1- TCLE.....	61
2- CEP.....	63

3- Ficha de dados e dosagem do suor.....	65
4- Escala de desconforto a estimulação elétrica.....	66
10-APÊNDICES.....	67
1- Histórico Escolar.....	67
2- Certificado PED.....	69
3- Submissão em Periódico.....	70
4- Anais em Congressos.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C - Graus Celsius

CAP - *College of American Pathologists*

CCC - Corrente Contínua Constante

CCP - Corrente Contínua Pulsada

CD - *Current Density*

CEP - Comitê Ética em Pesquisa

CF - *Cystic Fibrosis*

CIPED - Centro de Investigação em Pediatria

Cl⁻ - Cloreto

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

CFF - *Cystic Fibrosis Foundation*

CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CST - *Classic Sweat Test*

DC - Densidade de corrente

DCC - *Direct Constant Current*

DPC - *Direct Pulsed Current*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EVA - Escala Visual Analógica

EUA- Estados Unidos da América

FC - Fibrose Cística

I - Corrente

IMC - Índice de Massa Corpórea

I_{rms} - Corrente eficaz medida

J - Densidade

LAFIC - Laboratório de Fibrose Cística

LAFIP - Laboratório de Fisiologia Pulmonar

LHRH - Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante

MIM - *Monogenic Inheritance Disease*

MS - Ministério da Saúde

NaCL - Cloreto de Sódio

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

S - Área do eletrodo

TCLE - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TNN - Triagem Neonatal

TS - teste do suor

TSC - teste de suor clássico

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

V_{rms} - Tensão eficaz medida

Z - Impedância composta

WHO - *World Health Organization*

RESUMO

Introdução: O teste do suor clássico (TSC) é aceito como padrão-ouro para o diagnóstico da fibrose cística (FC). **Objetivo:** Comparar a estimulação e peso do suor produzido, os efeitos colaterais associados ao uso das correntes contínua pulsada (CCP) e contínua constante (CCC) e determinar o tempo ideal para a estimulação e para a coleta de suor em indivíduos com e sem FC. **Método:** Estudo de intervenção prospectivo de corte transversal. *Experimento 1 (braço direito):* CCC e CCP. Tempo de estimulação (TE) de 10min e o de coleta do suor de 30min. Correntes de 0,5; 0,75; 1,0; e 1,5mA e frequências de 0; 200; 1000; e 5000Hz. *Experimento 2 (braço esquerdo):* Corrente de 1,0mA; TE: 5 e 10min e coleta de 15 e 30min com frequências de 0; 200; 1000; e 5000Hz. Ambos os experimentos foram testados com densidade de corrente (DC) de 0,07 a 0,21mA/cm². *Experimento 3:* Avaliar a CCP e a CCC como métodos diagnósticos para a FC comparando com diagnósticos estabelecidos por estudos na biópsia retal e sequenciamento do gene *CFTR* (do inglês, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). **Resultados:** Participaram do estudo 48 sujeitos (79,16% do sexo feminino), com média de 29,54±8,87 anos de idade. Não houve diferença estatística entre a interação da frequência e da corrente no peso do suor (p=0,75). Houve associação do peso do suor com a frequência de estímulo (p=0,0088) e corrente utilizada para a obtenção de sudorese (p=0,0025). A produção de suor foi maior no tempo de 10min de estimulação (p=0,0023). A coleta do suor foi maior no tempo de 30min (p=0,0019). A impedância da pele não foi influenciada pelo TE e de coleta do suor (p>0,05). A frequência da corrente utilizada mostrou associação inversa com a impedância da pele (p<0,0001). A temperatura da pele mensurada antes da estimulação foi maior que a temperatura após a estimulação (p=0,0001). No experimento 3 (29 indivíduos) a CCP mostrou melhor índice *kappa* comparada a CCC (0.92 versus 0.52, respectivamente). **Conclusão:** A realização do TSC

tanto com CCC quanto CCP utilizando DC de 0,14 a 0,21mA/cm² mostrou eficácia nas etapas de estimulação e coleta de suor, sem efeitos colaterais. O tempo ideal para a estimulação e para a coleta de suor foi, respectivamente, 10 e 30min.

Palavras-Chave: Cloro; Diagnóstico; Glândulas de Suor; Suor; CFTR.

ABSTRACT

Background: The classic sweat test (CST) is still accepted as the gold standard method for cystic fibrosis (CF) diagnosis. **Objective:** To compare the production and volume of sweat, the side-effects caused by direct pulsed current (DPC) and direct constant current (DCC) and to determine the stimulation time for stimulation and sweat for collection in CF and non-CF individuals. **Method:** Prospective study of cross-sectional intervention. **Experiment 1 (right arm):** DPC and DCC. Stimulation time (ST) of 10min and sweat collection every 30min. Currents of 0.5; 0.75; 1.0; and 1.5mA and frequencies of 0; 200; 1000; and 5000Hz. **Experiment 2 (left arm):** current of 1mA, ST: 5 and 10min and collection at 15 and 30min interval with frequencies of 0; 200; 1000; and 5000Hz. Both experiments were tested with current density (CD) ranging from 0.07 to 0.21mA/cm². **Experiment 3:** To assess CF diagnosis by DPC and DCC methods by comparison with the established by rectal biopsy diagnosis studies and sequencing of the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene. **Results:** 48 subjects (79.16% female) with mean average of 29.54 ± 8.87 years old participated in this study. There was no statistical differences between the interaction of frequency and current in sweat weight (p=0.7488). An association was found between sweat weight with the frequency of stimulation (p=0.0088) and the current used for sweating (p=0.0025). The sweat production was higher for the 10min stimulation interval (p=0.0023). The best time interval for sweat collection was 30min (p=0.0019). The skin impedance was not influenced by ST and sweat collection time (p>0.05). The frequency of the current used was inversely associated with skin impedance (p<0.0001). The skin temperature measured before the stimulation was higher than after stimulation (p=0.0001). In experiment 3 (29 subjects), the DPC showed better kappa index compared to DCC (0.92 versus 0.52, respectively). **Conclusion:** ST performance with both DCC and DPC using a CD of 0.14 to 0.21mA/cm² showed efficacy in both of stimulation and sweat

collection steps, without side-effects. The optimal time for stimulation and sweat collection were, respectively, 10 and 30min.

Keywords: *Chloride; Diagnosis; Sweat Glands; Sweat; CFTR.*

1.0- INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose Cística

A fibrose cística (FC; MIM# 219700) é uma doença hereditária, autossômica recessiva, com maior prevalência em indivíduos caucasóides ocorrendo em 1:2.500. Afeta cerca de 70.000 indivíduos da população mundial (Barth, 2005; Riordan, 2008). No Brasil a FC acomete 1:10.000 nascidos vivos. É causada por dois genes *CFTR* do inglês (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) mutados. Até o momento, foram já identificadas cerca de 2000 mutações no gene *CFTR* composto por aproximadamente 250Kb de DNA com 27 éxons (Knowlton *et al.*, 1985; Wainwright *et al.*, 1985; Kerew *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Este gene tem a propriedade de codificar um RNAm de 6,5Kb, que transcreve uma proteína transmembrana reguladora de transporte iônico, denominada também CFTR, e composta por 1480 aminoácidos (Bear *et al.*, 1992; Welsh & Smith, 1993; Farrell *et al.*, 2008).

Como referido, existem aproximadamente 2.000 mutações descritas na literatura mundial, sendo a mutação F508del a mais frequente. Nela ocorre uma deleção de três pares de bases, causando perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína *CFTR* (Rowe *et al.*, 2005) (**Figura 1**).

Mutações no gene *CFTR* causam ausência, deficiência qualitativa ou quantitativa na proteína CFTR, i.e, canal de Cloro (Cl⁻) (Farrell *et al.*, 2008; Quinton, 2007). As mutações são classificadas em seis classes:

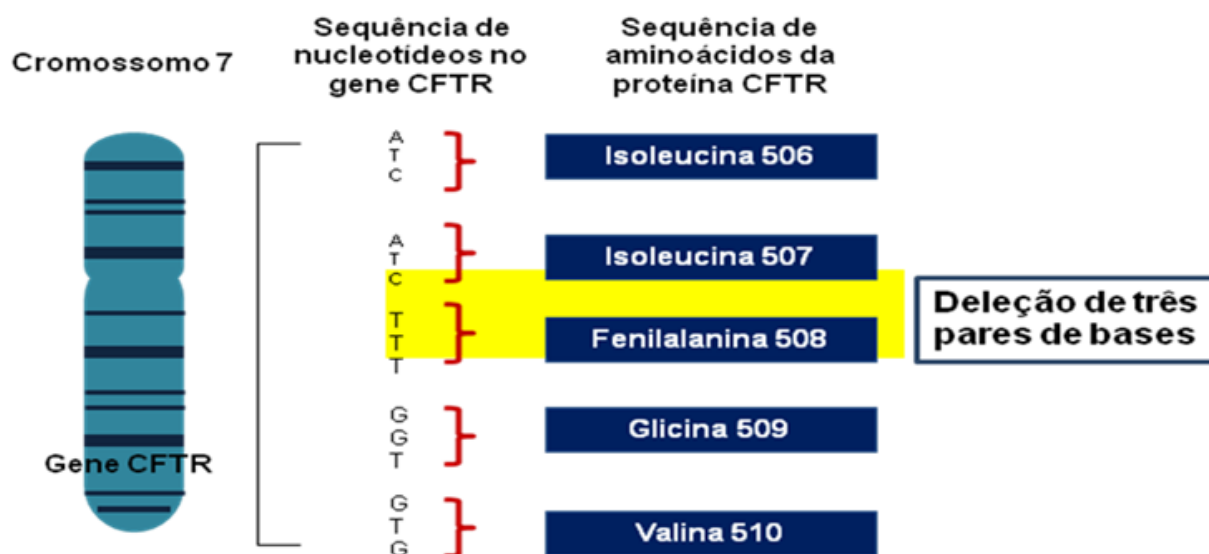


Figura 1. Gene da fibrose cística localizado no braço longo do cromossomo 7. A mutação F508del, ocorre quando há uma deleção de três pares de base, acarretando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína *CFTR* (Fonte: Gonçalves *et al.*, 2013 [Dissertação]).

- Classe II: nessa classe a proteína CFTR é transcrita, mas não sofre processo de maturação e migração adequada até a membrana plasmática, sendo degradada ainda no complexo de Golgi. Nessa classe também não ocorre proteína CFTR ativa na membrana que possibilite uma doença de menor gravidade, excetuando-se alguns casos esporádicos, nos quais temos pacientes com mutações nessa classe com uma doença mais leve. A mutação F508del está incluída nessa classe sendo a de maior frequência para a doença.

- Classe III: essa classe está associada à regulação alterada no canal de Cl⁻. Nesse contexto, a proteína não responde à estimulação pelo cAMP, com diminuição da ligação do ATP à CFTR e hidrólise. A consequência é a alteração da regulação do canal

iônico e diminuição de sua atividade, como é o caso da mutação G551D. As mutações dessa classe atuam diretamente no domínio regulador da proteína CFTR.

- Classe IV: nessa classe as mutações no gene *CFTR* estão associadas aos domínios transmembrana que acarretam uma alteração da condutância iônica pela CFTR na superfície celular. Devido à alteração decorrente da mutação, o fluxo dos eletrólitos pelos canais iônicos é menor. Nessa classe, temos mutações frequentemente associados com menor gravidade como, por exemplo, as mutações R117H, R334W e P20SS.

- Classe V: mutações nessa classe estão associadas à menor síntese de CFTR, no entanto com moléculas com função normal. Podemos encontrar nesta classe, como exemplo, as mutações 3849 + 10Kb C>T e 3272-26A>G.

- Classe VI: última classe a ser identificada e associada a produção de CFTR normal, mas com *turn-over* acelerado da superfície celular. Como exemplo, podemos citar a mutação Q1412X (Drumm *et al.*, 2012; Knowles & Drumm, 2012; Weiler & Drumm, 2013).

As mutações do gene *CFTR* apresentam elevada variabilidade de expressão, podendo ser descritas de leves a graves. A gravidade da mutação depende da maneira como a proteína CFTR é afetada, o transporte de Cl^- pode ficar diminuído ou não ocorrer. Na FC, mutações graves causam falha da síntese proteica ou no bloqueio do processamento até a membrana plasmática, e mutações leves resultam em disfunções na condutância, redução da síntese proteica ou em uma internalização acelerada da proteína na membrana plasmática (Johnson, 1997) (**Figura 2**).

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

Figura 2: As seis classes de mutações que causam FC, suas consequências e exemplos, onde MP=membrana plasmática. Adaptado de Zielenski e Tsui, 1995 e Haardt *et al.*, 1999.

Na FC, alterações na síntese e regulação da proteína CFTR acometem diferentes órgãos epiteliais, principalmente os pulmões, fígado, pâncreas, intestinos e glândulas do suor (Farrell *et al.*, 2008; Quinton, 2007).

1.2. Fisiologia das glândulas sudoríparas

A proteína CFTR está diretamente relacionada com o transporte de íons pela membrana celular e das suas funções é regular o fluxo Cl^- , Sódio (Na^+) e água (Mishra *et al.*, 2007). Os ductos sudoríparos foram estudados em 1983 pelo pesquisador Paul Quinton que descobriu o defeito do transporte de Cl^- na glândula sudorípara nos pacientes com FC (Quinton, 1983).

Nos ductos da glândula do suor, íons Cl^- são normalmente reabsorvidos pelos canais da proteína CFTR, regulando os níveis de eletrólitos no suor (Rowe *et al.*, 2005). Os valores normais da concentração de Cl^- no suor em crianças acima dos seis meses de idade e adultos saudáveis são valores inferiores a 40mmol/L e nos lactentes menores de seis meses a concentração normal é abaixo de 30mmol/L (Castellani *et al.*, 2009; Farrell *et al.*, 2008).

Indivíduos com FC apresentam nos ductos distais da glândula do suor defeitos na proteína CFTR com alterações na homeostase do Cl^- , Na^+ e redução da reabsorção de sais, apresentando concentrações de Cl^- no suor acima de 60mmol/L (**Figura 3**) (Quinton, 1983; Quinton, 2007).

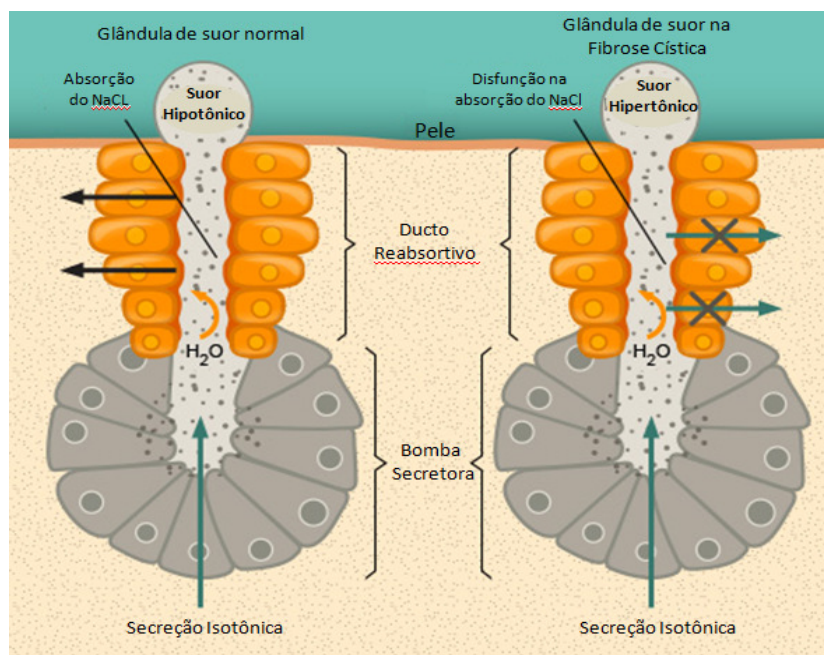


Figura 3. A glândula exócrina de suor. ESQUERDA: Suor normal é secretado, solução isotônica de cloreto de sódio e água é produzida. À medida que o suor passa ao longo do túbulo, cloreto de sódio (NaCl) é reabsorvido nas células dos ductos produzindo uma secreção hipotônica de suor. DIREITA: Na FC, o canal CFTR é incapaz de transportar cloreto para dentro das células do ducto produzindo suor com alta concentração de sal (**Fonte:** <http://cftr.info>; Quinton, 2007).

1.3. Teste do Suor

Desde a idade média sabia-se sobre a baixa expectativa de vida em indivíduos que possuíam suor salgado. Porém, nenhum progresso científico foi realizado ou obtido até a década de 50, que foi o primeiro grande marco para o conhecimento da FC.

O primeiro relato sobre níveis aumentados de Na^+ e Cl^- no suor, em pacientes com FC foi publicado em 1953 pelo médico pediatra Paul di Sant'Agnes e colaboradores. Eles observaram, em 1948, intermação (hipertemia) e excesso de Na^+ e Cl^- no suor nos pacientes com "fibrose cística do pâncreas" (denominação da doença na época), devido ao calor intenso presenciado em Nova York naquele ano. Esta

descoberta tornou possível utilizar o suor para realizar o diagnóstico da FC. Este exame passou a ser conhecido como teste do suor (TS) (Sant'Agneses *et al.*, 1953).

Para a realização do TS envolviam-se indivíduos com suspeita de FC em sacos plásticos até ao pescoço, por cerca de 1 a 3 horas de espera para a produção e coleta do suor (Webb *et al.*, 1957). Para otimizar a produção do suor, estes indivíduos ensacados eram também colocados em salas aquecidas, cobertos com cobertores, ou utilizavam garrafas pets com água quente em torno do leito (Figuras 4) (Misch & Holden, 1958; Webb *et al.*, 1957). Após a coleta do suor, os níveis de eletrólitos eram analisados pelo método de titulometria e fotometria de chama desenvolvida pelos pesquisadores Schales & Schales em 1941. O indivíduo era considerado com FC, quando os níveis de Cl^- estavam acima de 60mEq/L (Gibson & Cooke, 1959; Misch & Holden, 1958; Schales & Schales, 1941; Webb *et al.*, 1957).

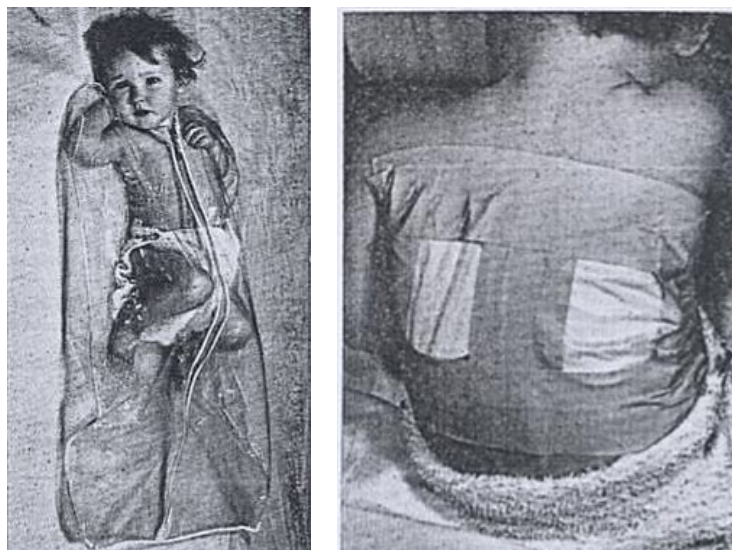


Figura 4: Realização do teste do suor em paciente envolto em plástico. (Fonte: Copyright 1956 Massachusetts Medical Society.)

Este método do TS descrito anteriormente foi utilizado apenas por cinco anos, devido a fatalidades ocorridas pelo superaquecimento na tentativa de obter o suor (Misch & Holden, 1958). Para facilitar a estimulação do suor e a dosagem dos eletrólitos, os pesquisadores Gibson e Cooke (1959) descreveram um método de estimulação colinérgica com pilocarpina, por iontoforese na pele. Avaliaram 25 pacientes com FC que apresentavam sintomas clínicos e sinais radiológicos com características da FC; 17 parentes assintomáticos; e 47 pacientes com outros sintomas clínicos, exceto problemas respiratórios e digestivos. Todos os pacientes com FC apresentaram níveis de Cl^- no suor superior a 80mEq/L e todos os controles apresentaram níveis de Cl^- no suor inferior a 60mEq/L. Este método ficou conhecido como teste do suor clássico (TSC) e até aos dias de hoje é considerado padrão-ouro para o diagnóstico da FC (**Figura 5**) (Farrell *et al.*, 2008; Karezeski & Cutting, 2006; Rosenstein, 1998; Rosenstein & Cutting, 1998; Strausbaugh & Davis, 2007; Taylor *et al.*, 2009).



Figura 5. Equipamento para o Teste do suor pelo método de iontoforese desenvolvido pelos pesquisadores Gibson e Cooke (1959) (**Fonte:** <http://cfmedicine.com>).

O TSC apresenta várias dificuldades para a sua realização, sendo dividido em três etapas: i) estimulação, ii) coleta e iii) dosagem dos eletrólitos (LeGrys, 1996). Na estimulação, podem ocorrer: baixa quantidade na produção do suor, dificuldades para imobilização da criança, estresse, queimaduras, dor, urticária, hiperemia e irritação, quando a densidade de corrente (DC) aplicada está acima de $0,5 \text{ mA/cm}^2$. Choque elétrico e pequenas lesões de pele podem ocorrer quando o metal do eletrodo entra em contato direto com a pele em caso de uso incorreto. A etapa de coleta é diretamente relacionada à competência técnica do profissional e podem ocorrer: contaminação, evaporação da amostra e tempo inadequado na coleta do suor. Na etapa de dosagem dos eletrólitos as dificuldades maiores incluem a falta de profissional especializado em realizar a análise do suor e variabilidade de marcas diferentes de equipamentos para dosagem do Cl^- e Na^+ (Gibson e Cooke, 1959; Gonçalves *et al.*, 2013; LeGrys, 1996; Mattar *et al.*, 2010).

Na tentativa de melhorar e otimizar as etapas do TSC, em 1990, foi validado o *kit Wescor Macroduct*, composto por eletroestimulador, coletor volumétrico tipo serpentina (Macroduct®) e analisador de eletrólitos por condutividade (*Sweat Check*®) (Webster, 1983; Wescor Inc. <http://www.wescor.com/biomedical/cysticfibrosis/macroduct.html>).

O procedimento de iontoforese pela pilocarpina deve ser realizado de forma meticulosa para evitar resultados falsos positivos ou negativos. Os Estados Unidos da América (EUA) desenvolveram o primeiro documento, conhecido como "*check list*", composto por itens de inspeção que deveriam ser cumpridos, rigorosamente, pelos

laboratórios que realizavam o TSC. As etapas do exame seriam as desenvolvidas pelos métodos de Gibson e Cooke (1959). Em 1994, os EUA possuíam um controle de qualidade externa e um consenso para a realização do TSC. (NCCLS, 1994; NCCLS, 2005; LeGrys, 2000; LeGrys, 2001).

Com a melhora da padronização do TSC nos EUA, o Reino Unido, em 2000, fez um estudo utilizando questionários a serem respondidos pelos centros pediátricos de referência em FC que realizavam o TSC. O objetivo do trabalho foi avaliar a metodologia utilizada com a intenção de uniformização e padronização do TSC. De entre as conclusões, verificaram que as equipes não estavam adequadamente treinadas, e que existiam complexidades e dificuldades na realização do TSC e na interpretação dos resultados obtidos. Observaram também que, para a eficácia do teste, era preciso auditoria frequente nos locais que o realizavam. Referiram à necessidade de se criar um padrão nacional, modelo, para diminuir a variabilidade dos procedimentos envolvidos nas etapas do TSC e dos métodos utilizados entre os centros. Também, propuseram a elaboração de “*guidelines*” para a coleta, análise e interpretação do TSC, que foi publicado em 2003 (Kirk *et al.*, 1992; Kirk, 2000; Green, 2005).

Após a divulgação dos “*guidelines*” supracitados, outros países também elaboraram suas próprias diretrizes sobre o TS, como por exemplo, França, Suécia, Alemanha, Canadá e Austrália (Collie *et al.*, 2014; Jakobson *et al.*, 2004; Naehrlich, 2007; Beauchamp *et al.*, 2005; Mackay *et al.*, 2006; Barben *et al.*, 2007; Sermet-Gaudelus, 2010). Nos EUA, a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) possui registros e realiza o diagnóstico molecular gratuito de todos os pacientes com FC. Os centros de

FC que são avaliados pela CFF necessitam de quesitos específicos para realização do TSC. Em 2006, uma comissão da CFF distribuiu um memorando com 23 diretrizes para a realização do TSC, aos diretores de centros em FC. Estes centros e laboratórios nos EUA necessitam ser credenciados pela CFF para realizarem o TSC para o diagnóstico de FC. Com a implantação da triagem neonatal (TNN), a CFF fez uma revisão dos “*guidelines*” e definiu que o TSC deveria ser realizado em todos os recém-nascidos pelo método quantitativo da iontoforese por pilocarpina para obtenção de Cl^- no suor de acordo com os procedimentos descritos no documento NCCLS C34-A2, sem modificação (LeGrys *et al.*, 2007).

As diretrizes para o TSC americano são baseadas no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), primeiro comitê para padrões de laboratórios clínicos, documento C34-A2 desenvolvido em 1994 pela *College of American Pathologists* (CAP). Este documento é mais exigente na uniformidade e foca no diagnóstico em vez do TS como triagem, ou seja, a análise do Cl^- deve ser realizada por métodos quantitativos enquanto, métodos qualitativos, que utilizam condutividade, para análise dos eletrólitos no suor, devem ser utilizados somente para triagem. (LeGrys *et al.*, 2007).

Após o desenvolvimento dos “*guidelines*” ficou determinado que o diagnóstico de FC fosse confirmado quando os níveis de Cl^- no suor se apresentam maiores que 60mmol/L, em duas dosagens distintas. Entre 30 e 59mmol/L ou entre 40 e 59mmol/L, para lactentes menores que seis meses e crianças maiores que seis meses/adultos respectivamente, o indivíduo é considerado com suspeita de FC e necessita de

acompanhamento especializado e exames complementares (Castellani *et al.*, 2009; Collie *et al.*, 2014; Farrell *et al.*, 2008;).

A análise da concentração do cloro no suor pode ser feita por titulação ou espectômetro, coulometria (cloridrômetro) e eletrodos de íon seletivo. A concentração do Na^+ pode ser analisada pela fotometria de chama, absorção atômica ou eletrodo de íon seletivo. Estes são os métodos satisfatórios para a dosagem destes íons no suor (Castellani *et al.*, 2009; Farrell *et al.*, 2008; Gibson & Cooke, 1959).

Apesar dos “*guidelines*”, Americano e do Reino Unido, sobre a realização do TSC, alguns estudos europeus mostraram baixa adesão aos mesmos, causada por dificuldades de interpretação de definições e procedimentos propostos. Estes autores destacaram a necessidade da adesão a estes “*guidelines*” e auditoria constante nos laboratórios que realizavam o TSC, principalmente nos casos de testes duvidosos. (Mackay *et al.*, 2006; Cirilli *et al.*, 2008).

O TSC duvidoso pode estar relacionado com os diferentes graus de disfunção da CFTR (Knowles & Durie, 2002; Wilschanski *et al.*, 2006; Ooi *et al.*, 2011; Gonska *et al.*, 2012). Nestes casos de valores intermediários dos eletrólitos no suor, para se confirmar o diagnóstico de FC são necessários exames complementares que mostram alterações da função da CFTR. A avaliação da proteína CFTR pode ser realizada em quatro sítios: (i) glândula sudorípara: TSC convencional; teste da condutividade elétrica do suor; diferença de potencial inter-glandular; evaporação do suor pelo teste do evaporímetro; (ii) mucosa nasal: diferença de potencial nasal; (iii) glândula salivar:

dosagem de Cl^- e Na^+ na saliva; e (iv) mucosa retal: estudos eletrofisiológicos através da medição das correntes de curto circuito diretas ou equivalentes associadas à CFTR (Farrell *et al.*, 2008; Gibson & Cooke, 1959; LeGrys *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2013; Gonska *et al.*, 2009; Gonska *et al.*, 2012; Naerhrlich *et al.*, 2014; Quinton *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2012).

1.4. Teste do suor no Brasil

Os fatos anteriormente descritos constituem dificuldades para padronização do TSC no Brasil. Além do nosso país não possuir diretrizes, muitos centros e laboratórios não seguem “guidelines”. Nós ainda possuímos equipamentos de indução de suor que são, na maioria, fabricados pelos centros universitários de referência em FC e não possuem autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Recentemente, o governo brasileiro publicou no diário oficial a portaria de número 288 no dia 21 de Março de 2013 sobre as diretrizes para o TSC em nosso país. Nesta portaria constam 29 centros de referência em FC cadastrados, que realizam a TNN, estando 25% dos centros localizados no Estado de São Paulo (SP) (MS Brasil. Portaria nº 288).

De acordo com as descrições da portaria de número 288, o Ministério da Saúde (MS) autorizou o indutor de suor Webster[®], modelo 3700, que utiliza o princípio de iontoforese por pilocarpina em gel, e de um conjunto de coletores de suor Macroduct[®] (Wescor[®], USA, Utah), para a realização do TSC (Webster, 2001; Hammond *et al.*, 1994; MS Brasil. Portaria nº 288). As etapas de realização do TSC pela Wescor[®]

baseiaram-se na utilização de um kit próprio para estimulação, coleta e dosagem do Cl^- no suor. Devido a dificuldades de aquisição e manutenção do aparelho da Wescor®, poucos laboratórios brasileiros possuem o equipamento. Existem também, confusões em relação aos procedimentos de dosagem nas descrições. O MS destaca que o laudo deverá ser feito com resultados quantitativos, mas em suas descrições sobre as técnicas de análise de Cl^- ele cita que a análise poderá ser feita por condutividade, o que é uma técnica qualitativa. Sendo assim, os centros de referência e laboratórios que realizam o TSC para o diagnóstico de FC, utilizam aparelhos não padronizados (MS Brasil. Portaria nº 288).

Estudo piloto realizado por Servidoni e colaboradores (Apêndice 4), apresentado no Congresso Brasileiro de Pneumologia Pediátrica, em Maio de 2014, relata os problemas da falta de padronização do TSC no estado de São Paulo. Da mesma forma, as descrições do TSC realizados pelo MS, Portaria nº 288/2013, são contraditórias, o que pode causar diagnóstico incorreto e ansiedade para o centro que realiza o exame, para os pais e pacientes.

1.5. Dispositivos de iontoforese

A estimulação foi padronizada por Gibson e Cooke (1959) e aprimorada em 1983 pelo uso do *Webster Sweatinducer* (Webster, 1983), sistema utilizado junto com o *kit Wescor Macroduct* validado em 1990 (Hammond *et al.*, 1994; Wescor Inc. <http://wescor.com/biomedical/cysticfibrosis/macroduct.html>). Após esses relatos na história do TSC, estudos sobre os benefícios da iontoforese foram explorados para

outros fins, porém o TSC não sofreu modificações desde esse momento. Vantagens da utilização da iontoforese com Corrente Contínua Pulsada (CCP) sobre a Corrente Contínua Constante (CCC) têm sido demonstradas por pesquisadores, em estudos relacionados à entrega das drogas transdérmicas (Bagniefski & Burnette, 1990; Huang & Wu, 1996; Knoblauch & Moll, 1993; Sabbahi *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1994). Enquanto estes estudos favorecem a utilização da CCP para a penetração de substâncias na pele, incluindo a pilocarpina, os testes para estimulação de suor somente utilizam a CCC (Gibson & Cooke, 1959; Webster, 1983).

A CCC, também denominada de corrente direta ou galvânica, é um fluxo de corrente que não varia com o tempo, ou não altera sua polaridade, tendo frequência de 0 Hz (Licht, 1970; Nelson *et al.*, 2003). Enquanto a CCP apresenta fluxo uni ou bidirecional de partículas carregadas que, periodicamente, param por um período de tempo finito (Gussow, 1985; Gutmann, 1980; Millman & Taub, 1965).

Os dispositivos de iontoforese indutores de suor relatados na literatura utilizam CCC aplicada por dois eletrodos fixados no antebraço do indivíduo. A corrente utilizada para estimulação do suor varia entre 1,5 a 5mA e o tempo de estimulação é de 5 ou 10min. Após a estimulação da iontoforese com pilocarpina líquida ou gel para a indução do suor, o mesmo é coletado em 30min. Para coletas realizadas em gaze ou papel de filtro, é necessário o mínimo de 75mg de suor. Para métodos que utilizam serpentina de plástico ou tubo capilar o ideal é o mínimo de 15µL de suor. Finalmente, as amostras de suor coletadas são encaminhadas para a análise da concentração de Cl^- e Na^+ (Castellani *et al.*, 2014; Gibson & Cooke, 1959; Farrell *et al.*, 2008; Webster, 2001).

Estudos demonstraram que a DC máxima suportada pelos seres humanos para a iontoforese não deve ultrapassar $0,5\text{mA}/\text{cm}^2$ (Banga & Chien, 1988; Phipps *et al.*, 1989). Existem relatos sobre a eficiência na entrega de substâncias, através da pele, com o uso da CCP, sem causar riscos de queimadura e desconforto quando comparada a CCC (Huang & Wu, 1996; Knoblauch & Moll, 1993; Bagniefski & Burnette, 1990; Sabbahiet *al.*, 1994; Su *et al.*, 1994). Por outro lado, alguns autores têm encontrado maior, menor ou igualdade de eficácia, entre a CCC e a CCP para permeação de substâncias na pele por iontoforese (Numajiri *et al.*, 1993; Zakzewski *et al.*, 1992; Bagniefski & Burnette, 1990; Preat & Thysman, 1993).

2- JUSTIFICATIVA

O TS é um exame confirmatório, fundamental para o diagnóstico preciso e seguro nos casos de suspeita da FC. Antes da introdução do exame de TNN para FC, o diagnóstico era feito tardiamente, geralmente com as crianças gravemente desnutridas.

Devido à necessidade de se obter controle clínico precoce e consequentemente melhor prognóstico desses pacientes, a FC passou a fazer parte da fase III da TNN, popularmente conhecido como teste do pezinho. Iniciou-se em 2010 no Estado de SP e a partir desse momento houve aumento na demanda do TS.

A falta de padronização do TSC no Brasil constituiu uma grande dificuldade para o diagnóstico acurado da FC. O MS publicou na portaria nº 288 de 21/03/2013 a inclusão do TS na tabela do Sistema Único de Saúde (SUS), utilizando o sistema *Wescor Macroduct*[®] para a realização do mesmo, embora este *kit* seja importado e de difícil acesso. Além disso, existem inconsistências técnicas nas descrições da portaria supracitada do MS do Brasil.

Frente a esta problemática, o desenvolvimento de um equipamento indutor de suor com a finalidade de avaliar um protótipo brasileiro para o diagnóstico de FC e consequentemente a padronização do TS, constitui uma medida promissora.

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos das CCC e da CCP no TSC, gerada por um dispositivo indutor de sudorese, desenvolvido pelo setor de Engenharia Biomédica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.2. Objetivos específicos

- A) Avaliar a eficácia da estimulação e produção de suor pelas CCP e CCC para o diagnóstico de FC;
- B) Comparar o peso do suor produzido através da estimulado pelas CCP e CCC;
- C) Determinar o tempo ideal de estimulação do suor;
- D) Determinar o tempo ideal de coleta do suor;
- E) Comparar a impedância da pele pela CCP e CCC;
- F) Avaliar os efeitos colaterais causados pela CCP e CCC;
- G) Comparar o diagnóstico de FC pelo TSC com CCP e CCC aos diagnósticos previamente estabelecidos e pela técnica de biópsia retal e pesquisa de mutações do gene *CFTR*.

4- CASUÍSTICA E MÉTODO

4.1. Desenho do estudo

Estudo de experimental prospectivo de corte transversal.

4.2. População do estudo

No período de Outubro de 2012 a Fevereiro de 2014 foram incluídos e analisados 77 indivíduos, sendo 19 com FC confirmada e 10 descartadas FC pelas outras análises, atendidos regularmente no Centro de Referência em FC do Hospital de Clínicas da Unicamp; e 48 indivíduos saudáveis.

4.2.1. Critérios de inclusão

4.2.1.1. Pacientes com suspeita e com FC

Foram incluídos no estudo pacientes de 06 a 46 anos, com suspeita ou com diagnóstico de FC. Estes pacientes são acompanhados no Ambulatório de FC do Hospital de Clínicas/UNICAMP, os exames considerados neste estudo que comprovam que os pacientes são portadores de FC são: identificação de duas mutações no gene *CFTR*, dois testes de Cl⁻ no suor positivo pelo método de iontoforese com pilocarpina utilizando a CCC e avaliação da CFTR por biópsia retal, todos compatíveis. Os pacientes que consideramos suspeitos neste estudo são aqueles que possuem inconsistências nos exames supracitados. Pacientes e/ou responsáveis que concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**).

4.2.1.2. Indivíduos saudáveis

Foram incluídos no estudo indivíduos acima dos 18 anos de idade, alunos e funcionários do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), incluindo os laboratórios de fisiologia pulmonar (LAFIP) e de fibrose cística (LAFIC). Os indivíduos concordaram e assinaram o TCLE (**Anexo 1**).

4.2.2. Critérios de não inclusão ou exclusão

Pacientes com suspeita e/ou diagnóstico de FC que não consentiram participar do estudo ou que apresentaram estudo genético, teste do suor incompleto ou inconclusivo e não realizaram a biópsia retal.

Indivíduos saudáveis que não consentiram participar do estudo.

4.3. Aspectos éticos

O projeto foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e somente após a aprovação foi iniciado a pesquisa. Parecer registrado sob o número #80430/2012 (**Anexo 2**). Foram respeitadas as condições éticas pertinentes ao protocolo e seguidos rigorosamente os princípios enunciados na Declaração de Helsink II de 20/08/1947 e Resolução 196/96 da CONEP. Os sujeitos foram incluídos somente após assinatura do TCLE por escrito (**Anexo 1**) para os maiores de 18 anos e por um dos pais ou responsável legal, mantendo o anonimato dos mesmos bem como dos dados colhidos.

4.4. Métodos

Foram selecionados indivíduos saudáveis (n=48), de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade e pacientes com suspeita e diagnóstico de FC (n=29) acima de 6 anos de idade, de ambos os sexos.

Para realização do TSC, utilizou-se aparelho indutor de suor desenvolvido pelo Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp (**Figuras 6 a 9**); i.e, dispositivo de iontoforese, portátil, de fácil manuseio, com possibilidade de seleção entre a CCC e CCP (com forma de onda triangular, com variação de frequência entre 0 a 5000Hz), corrente máxima de saída de 5mA, *software* de apoio às configurações e aquisição de dados, e dois eletrodos compostos por 70% de cobre e 30% de zinco (latão) com 30mm de diâmetro (**Figuras 10 a 12**).

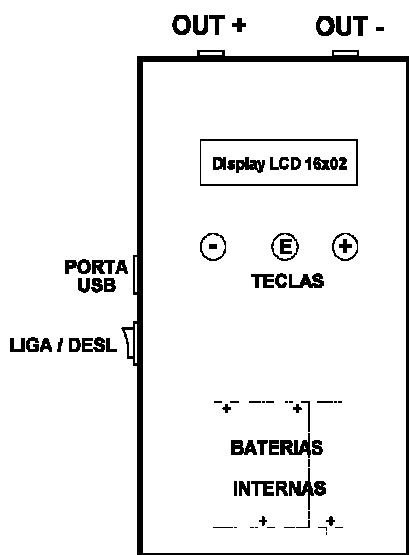


Figura 6. Aparelho de estimulação esquematizado.



Figura 7. Imagem do aparelho de estimulação.

Eletró-estimulador de sudorese			
CONFIGURAÇÃO DE TESTE		AQUISIÇÃO	
Porta de Comunicação \\COM3		Dados do Arquivo 03/06/2013 16:10 Tsample[ms] 100 Tteste[m] 001 Namost 00600 Freq[Hz] 00200 Forma: Valor Corr./100[mA] 200	
Pasta / Nome do Arquivo [C:\Users\Del\Documents\PROJETOS_E_CIRCUITOS\Gerador_10mA_DDS_Rev2\TESTES\11.txt]			
Tempo de Amostragem [ms] 500	Corrente [mA] 1,5		
Tempo de Teste [m] 10	Valor da Medida Instantâneo	String de Configuração s200100006000020041r	
Frequência [Hz] 1000	Forma de Onda Triângulo	AVANÇAR	

Figura 8. Esquema do *software* de apoio às configurações e aquisições de dados.

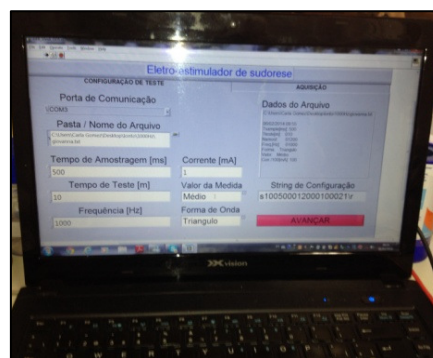


Figura 9. Imagem do *software* de apoio às configurações e aquisições de dados.

1	C:\Users\Del\Documents\PROJETOS_F_CIRCUITOS\Gerador_10mA_DDS_Rev2\Teste1.txt				
2					
3	18/03/2013	11:56			
4	Tsample[ms]:	500			
5	Tteste[m]:	1			
6	Namost:	120			
7	Freq.[Hz]:	200			
8	Forma:	Contínuo			
9	Valor:	Médio			
10	Corr./100[mA]:	100			
11	Ntotal:	120			
12	N Amostra	Data	Hora	Tensão/10 [V]	Corrente/10 [mA]
13	0	18/03/2013	11:56	36	89
14	1	18/03/2013	11:56	40	80
15	2	18/03/2013	11:56	44	71
16	3	18/03/2013	11:56	48	65
17	4	18/03/2013	11:56	50	65
18	5	18/03/2013	11:56	51	67
19	6	18/03/2013	11:56	52	69
20	7	18/03/2013	11:56	53	71
21	8	18/03/2013	11:56	54	72
22	9	18/03/2013	11:56	55	74
23	10	18/03/2013	11:56	55	76
24	11	18/03/2013	11:56	56	77
25	12	18/03/2013	11:56	56	78
26	13	18/03/2013	11:56	57	80

Figura 10. Esquema da aquisição dos dados no excel.

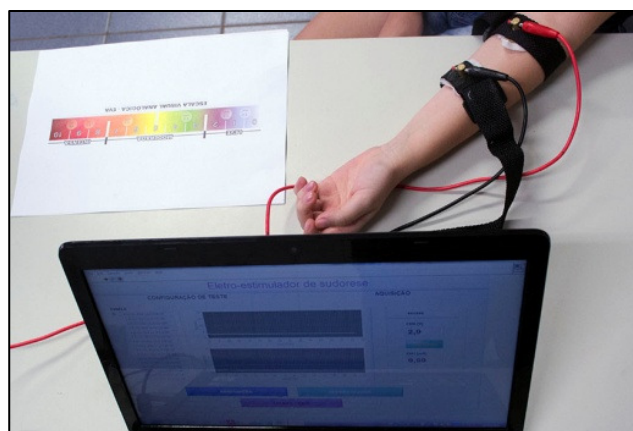


Figura 11. Imagem do momento da aquisição dos dados



Figura 12. Eletrodos de 70% de cobre e 30% de zinco com 30mm de diâmetro.

Em todos os testes a temperatura da sala foi estabilizada em 25°C e a DC aplicada foi previamente calculada, de acordo com a equação $J = I/S$, onde J= densidade, I= corrente e S=área do eletrodo.

Foram consideradas as variáveis sexo, etnia, idade e índice de massa corpórea (IMC) (**Anexo 3**). O cálculo do IMC foi realizado pela fórmula: peso (Kg)/ altura²(m) de acordo com *World Health Organization* (WHO, 2000).

Foram realizados três conjuntos de experimentos:

Experimento 1 – braço direito indivíduo saudável (frequência e corrente selecionada aleatoriamente) (Tabela 1)

Tabela 1. Esquema de coletas do experimento 1, onde os números em azul correspondem aos indivíduos, com tempo de estímulo de 10min e de coleta de 30min.

Frequência (Hz)	Corrente (mA)			
	0,5	0,75	1,0	1,5
0	1	2	3	4
200	5	6	7	8
1000	9	10	11	12
5000	13	14	15	16

HZ, hertz; mA, miliampere.

Experimento 2 – braço esquerdo indivíduo saudável (Tempo de estimulação, tempo de coleta e frequência selecionada aleatoriamente) (Tabela 2).

Comparar o peso de suor e a impedância do conjunto eletrodo-pele com a variação dos tempos de estimulação e coleta. Para isso foi aplicada corrente de 1mA

fixa em todos os testes. Foram utilizados tempos de estimulação de 5 e 10min e coleta de 15 e 30min com frequências de 0, 200, 1000 e 5000Hz.

Indivíduos considerado de A a P em 3 grupos.

Tabela 2. Esquema de coletas do experimento 2, onde as letras em azul correspondem aos indivíduos. Os dados foram analisados com 1mA de corrente fixa aplicada.

Frequência (Hz)	Tempo de estimulação x Tempo de coleta (min)			
	5 x 15	5 x 30	10 x 15	10 x 30
0	A	B	C	D
200	E	F	G	H
1000	I	J	K	L
5000	M	N	O	P

Hz, hertz; mA, miliampere; min, minuto.

Experimento 3: braço direito dos pacientes com suspeita e com FC (CCP, corrente de 1mA, frequência de 1000Hz, tempo de estimulação de 10min e tempo de coleta de 30min) (Figura 13).

Comparar o volume de suor e níveis de Cl^- pelas CCP e CCC. Comparar o diagnóstico do TSC com os resultados da biópsia retal e de pesquisa de mutações no gene *CFTR*.

O TSC foi realizado pelo método proposto por Gibon e Cooke, 1959, considerando os experimentos anteriormente citados e realizados em três etapas:

Etapa 1: Estimulação (Figura 13)

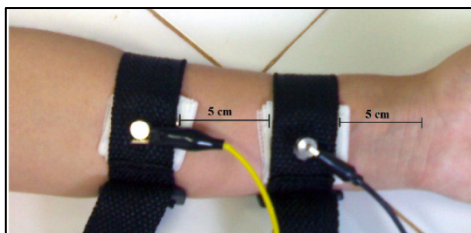


Figura 13. Estimulação

Iniciou-se com a limpeza da pele do antebraço com água destilada e secagem com gaze estéril. Antes da fixação dos eletrodos no antebraço, a temperatura da pele foi medida em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) com termômetro infravermelho digital (*karkneethermometer*[®], modelo DT8806C) no eletrodo positivo. A medida foi repetida após estimulação.

Os eletrodos foram fixados por meio de presilhas, sobre a gaze embebida em solução de pilocarpina 0,5% (eletrodo positivo) e ácido sulfúrico 0,004N (eletrodo negativo). Foi adotada distância de cinco centímetros entre os mesmos.

Durante a estimulação obteve-se a avaliação do desconforto, que foi realizada pela escala visual analógica (EVA) (**Figura 14**) (Carlsson, 1983). O grau de desconforto foi avaliado no primeiro, quinto e último minuto (**Anexo 4**).

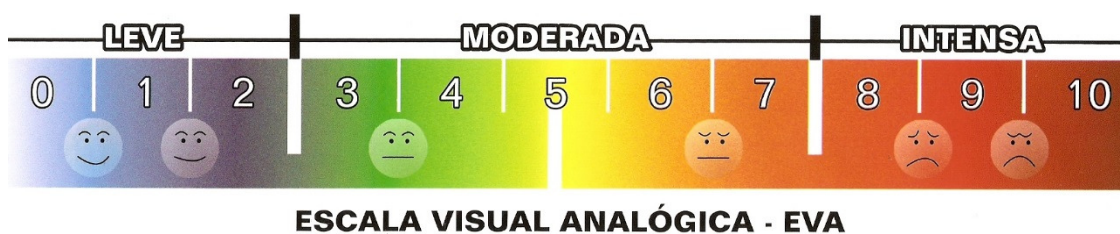


Figura 14. Avaliação do desconforto através da escala EVA. (Adeptado de Carlsson, 1983)

De forma secundária, a eletroestimulação e a impedância composta (Eletrodo – Gaze – Pele) foram medidas durante o tempo de estimulação para análise das

características elétricas da pele frente à sensibilidade e ao desconforto observada na escala EVA. A lei de Ohm foi utilizada para o cálculo da impedância, de acordo com a equação $[Z = V_{RMS}/I_{RMS} (\Omega)]$. Sendo, Z = impedância composta (Ω); V_{RMS} = tensão eficaz medida (V); I_{RMS} = corrente eficaz medida (A).

Etapa 2: Coleta (Figura 15)



Figura 15. Coleta do suor com papel filtro vedado com plástico film e atadura crepe.

Ao término da estimulação elétrica, a pele foi limpa com água destilada e seca com gaze estéril, para colocação de dois papéis de filtro de cerca de $17,5\text{cm}^2$ ($4 \times 4,30$ cm de área, com peso de aproximadamente 327mg), cobertos com plástico e atadura de crepe. Os papéis de filtro foram retirados após o tempo pré-estabelecido com uma pinça. Posteriormente, foram colocados no frasco de vidro com tampa, pré-pesados e pesados novamente em balança analítica digital (Modelo OD. AUY-220 220GX0,0001, Ref.

AUY-220, Shimadzu®). Em seguida, foram acrescentados 10ml de água destilada e encaminhado para a análise laboratorial dos níveis de Na^+ e Cl^- .

Etapa 3: Dosagem (Figuras 16 e 17).

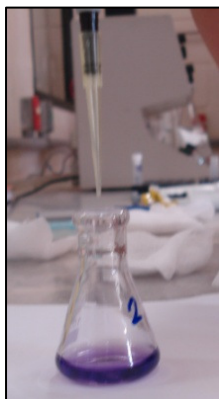


Figura 16. Titulometria do Cloro

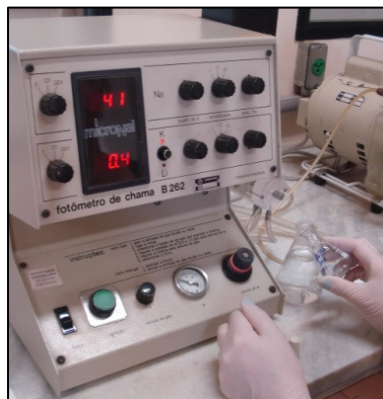


Figura 17. Fotometria de chama do sódio

A concentração de Cl^- foi mensurada pela titulação manual e a concentração de Na^+ pela fotometria de chama. Os resultados foram expressos em mEq/L (Gibson & Cooke, 1959; Farrell *et al.*, 2008; Castellani *et al.*, 2009.) (**Anexo 3**).

4.5. Análise estatística

Utilizou-se o programa SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows, vs 9.2. (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary-NC-USA) para análise dos dados. Os gráficos foram construídos pelo programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) vs 21.0 (IBM®, Armonk, NY-USA) e Med Cal 13.2.2 (Med Calc Software, Acacialaan 22,

B-8400 Ostend-Belgium). As variáveis numéricas foram apresentadas por medidas de posição e dispersão.

Experimento 1 e 2: para comparação dos parâmetros entre os efeitos estudados foi utilizada análise de variância (ANOVA). Para comparação dos parâmetros avaliados em dois momentos utilizou-se ANOVA para medidas repetidas. Aplicou-se a transformação por postos devido à ausência de distribuição normal nas respostas.

Experimento 3: a comparação entre os valores de CI e peso do suor para CCC e CCP dos pacientes com FC foi realizada pela análise de correlação de Spearman (medida de correlação não paramétrica, isto é, descrição da relação entre duas variáveis). A comparação como método diagnóstico para a CCP em relação a CCC foi realizada pelo cálculo do índice *Kappa* (medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o 1, onde este valor 1 representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de 0, indicam nenhuma concordância, ou a concordância foi exatamente a esperada pelo acaso).

O nível de significância adotado foi de $\alpha > 0,05$. Os resultados estão apresentados em tabelas e gráficos.

5.0- RESULTADOS

Foram incluídos 77 indivíduos, 48 saudáveis (79,16% do sexo feminino), com média de $29,54 \pm 8,87$ anos de idade e 29 com suspeita e com FC (75,5% do sexo feminino) com média de $24,37 \pm 12,11$ anos de idade. A caracterização dos pacientes com suspeita e com FC está na **Tabela 3**.

Tabela 3. Caracterização clínica dos pacientes com suspeita e com fibrose cística incluídos no estudo

Variável (n=29)	Distribuição
Sexo (masculino)	10/29 (34,5%)
Etnia (caucasóide)	25/29 (86,2%)
Idade (anos)	$24,37 \pm 12,106$; 21 (6-46)*
Altura (m)	$1,56 \pm 0,154$; 1,58 (1,22 - 1,87)*
Peso (Kg)	$50,078 \pm 13,81$; 52 (26,8- 76,6)*
Índice de massa corpórea	$20,21 \pm 3,60$; 19,71 (13,20 - 29,65)*

* Os resultados são média $\pm$ desvio padrão; IMC (Intervalo)

Indivíduos saudáveis

-Experimento 1:

Após estimulação durante 10 min e coleta após 30 min, não houve diferença estatística entre interação da frequência e corrente relativamente ao peso do suor ($p=0,75$) (**Tabela4; Figura18**). Os participantes do experimento 1, 100% (48/48) obtiveram peso de suor suficiente ($> 54\text{mg}$) com o uso de baixas e de altas frequências. Contudo, não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,35$).

No entanto, isoladamente, houve associação entre peso do suor e frequência de estímulo ($p=0,0088$; **Figura 18B**) com a corrente utilizada para a obtenção de sudorese ($p=0,0025$; **Figura 18A**).

Tabela 4. Peso do suor(mg) em diferentes frequências (blocos) e correntes (tratamento).

Frequência (Hz) *	Corrente (mA) #			
	0,5	0,75	1	1,5
0 (CCC)	167 ± 59	173±122	236 ± 36	328±118
200 (CCP)	78 ± 20	91±32	189±55	150±42
1000 (CCP)	146 ± 8	254 ± 111	300±137	226±166
5000 (CCP)	136 ± 32	125 ± 12	221±90	212±57

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz; mA, miliampere. * Na análise considerando a frequência em relação ao peso do suor obtido, p-value = 0,0088; # Na análise considerando a corrente em relação ao peso do suor obtido, p-value = 0,0025; para a interação entre a corrente e frequência em relação ao valor do peso do suor, p-value = 0,75.

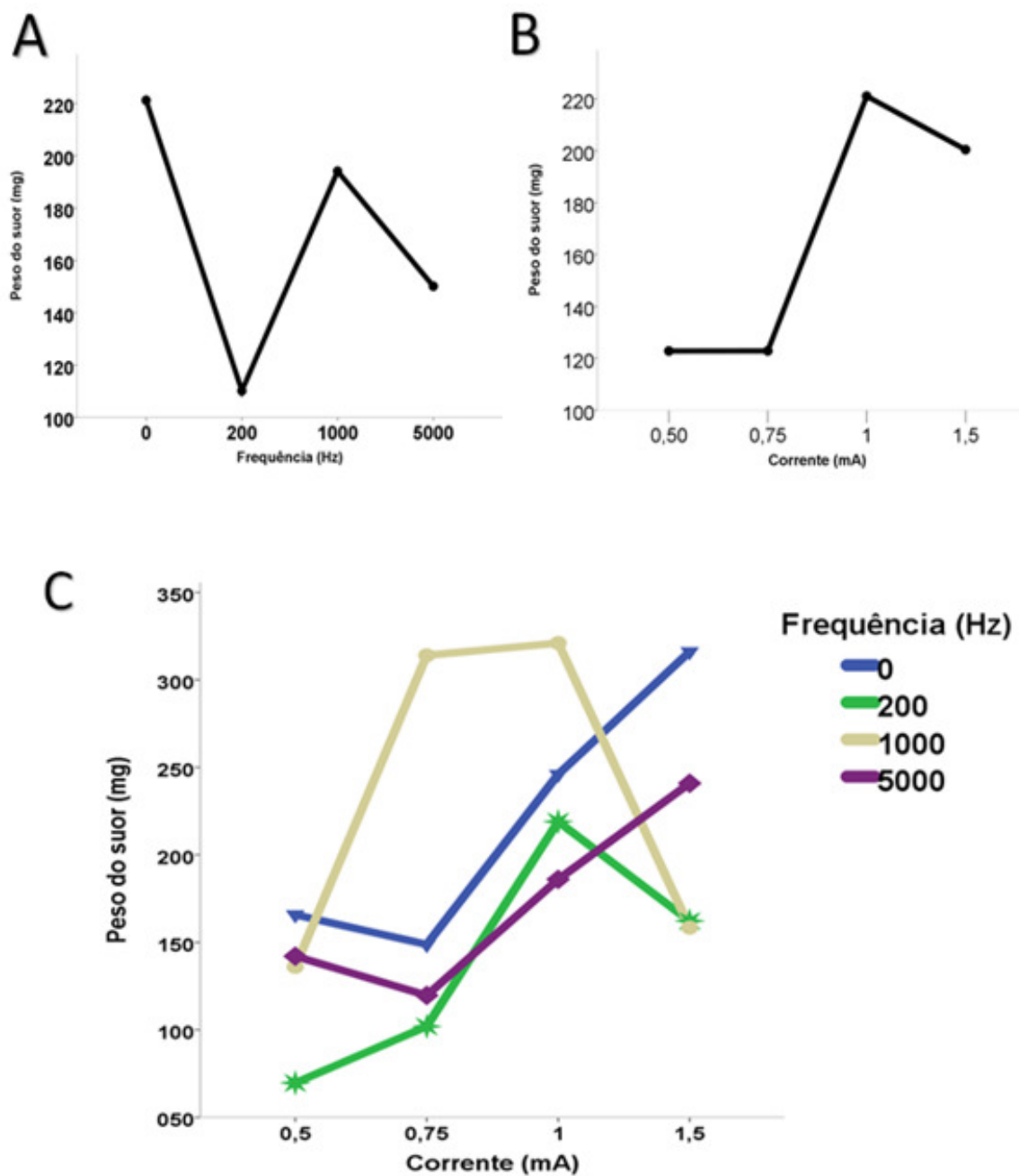


Figura 18. Associação do peso do suor com valores de corrente e frequência diferentes com tempos fixos de estimulação (10m) e coleta (30 min). A. Variação por corrente. B. Variação por frequência. C. Fator interação corrente e frequência.

A impedância da pele foi influenciada pela corrente ($p=0,0007$; **Figura 19A**) e pela frequência ($p=0,0003$; **Figura 19B**). No entanto, quando consideramos a interação entre os dois fatores, não foram detectadas diferenças ($p=0,99$; **Figura 19C**) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Dados da impedância em Ohm para frequências e correntes, com tempo fixo de 10min de estimulação e 30min de coleta.

Frequência (Hz)*	Corrente (mA)#			
	0,5	0,75	1	1,5
0 (CCC)	11303,4±5487,4	11339,3±7507,5	8178,2±2004,9	5685,5 ± 838,5
200 (CCP)	8615,9 ± 4763,1	6086,4 ± 1278,4	5995,3±1592,9	4727,6 ± 562,7
1000 (CCP)	6787,3 ± 1997,8	4387,7 ± 703,0	4198,1±2125,4	2975,2 ± 216,2
5000 (CCP)	6221,3 ± 1962,3	4480,2 ± 450,5	4462,3±1848,2	3226,1 ± 159,6

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz, mA, miliampere. * Na análise considerando a frequência em relação à impedância, $p\text{-value}= 0,0007$; # na análise considerando a corrente em relação à impedância, $p\text{-value}= 0,0003$; para a interação entre a corrente e a frequência em relação à impedância, $p\text{-value}= 0,99$.

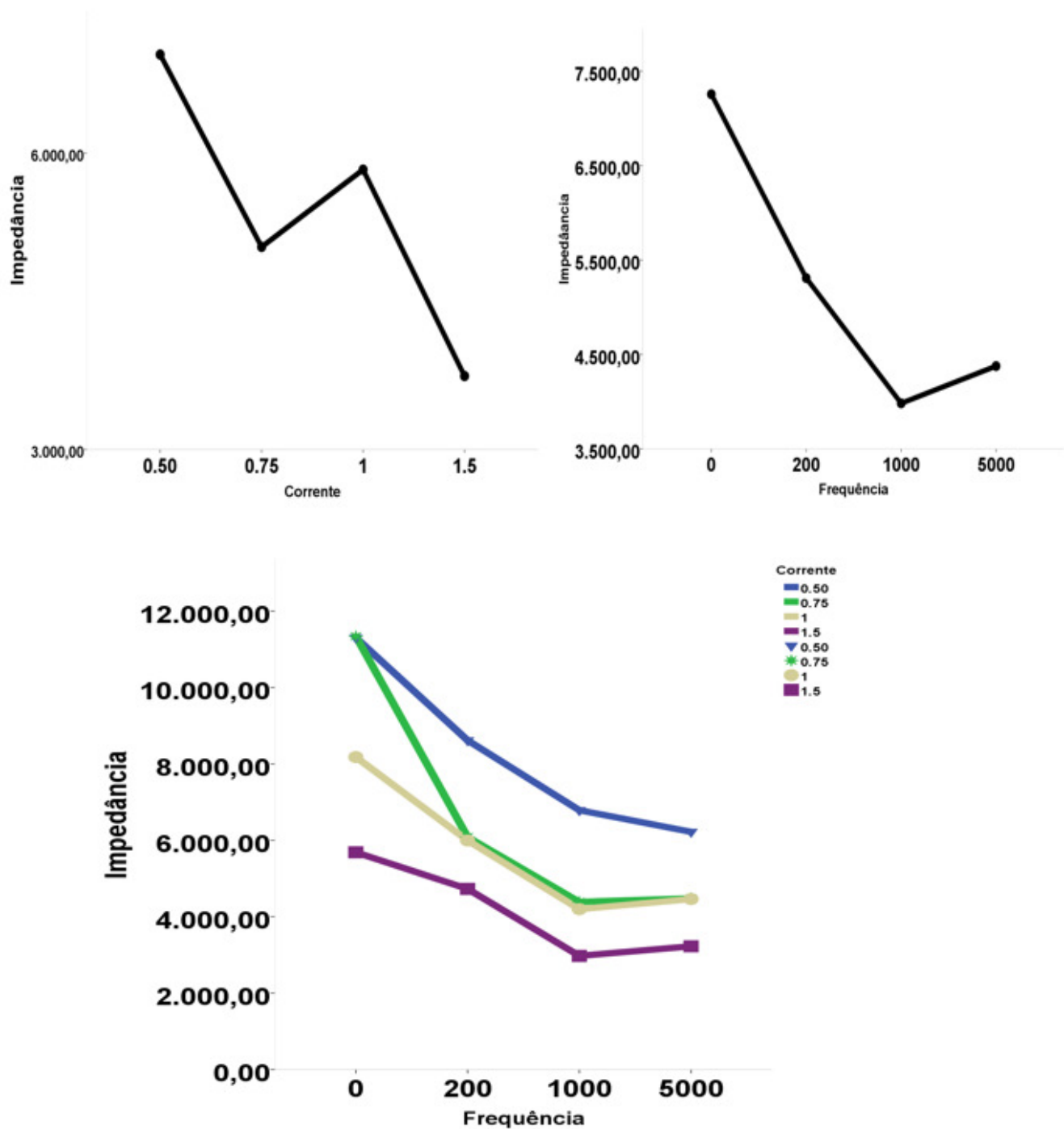


Figura 19: Correlação em relação à impedância, p-value= 0,0003. frequência em relação à impedância, p-value = 0,0007. Interação entre a corrente e a frequência em relação à impedância, p-value = 0,99.

Experimento 2:

Obteve-se maior produção de suor, por estimulação, no tempo de 10min versus 5min ($p=0,0023$). O tempo de coleta após 30min permitiu maiores volumes de suor do que o tempo de 15min ($p=0,0019$) (**Tabela 6; Figura 20**). O experimento 2, apresentou 41,6% (10/24) dos voluntários com peso de suor insuficiente ($<54\text{mg}$) com tempo de estimulação de 5min contra 4,1% (1/24) dos indivíduos testados com tempo de estimulação de 10min ($p=0,008$).

Tabela 6. Peso do suor (mg) com frequências e tempo para estimulação e coleta do suor, com corrente fixa de 1 mA.

Frequência (Hz) *	Tempo de estimulação x tempo de coleta do suor #			
	10 x 30	10 x 15	5 x 30	5 x 15
0 (CCC)	160 ± 51	76 ± 48	187 ± 204	41 ± 9
200 (CCP)	137 ± 31	118 ± 144	147 ± 45	77 ± 39
1000 (CCP)	222 ± 74	138 ± 70	83 ± 88	80 ± 49
5000 (CCP)	267 ± 73	164 ± 88	111 ± 30	69 ± 63

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz; mA, miliampere. * Na análise considerando tempo de estimulação, $p\text{-value} = 0,0023$ ($10 > 5$ min); # Na análise considerando o tempo de coleta, $p\text{-value} = 0,0019$ ($30 > 15\text{min}$). Para frequência ($p = 0,47$), frequência*tempo de estimulação ($p = 0,30$), frequência*tempo de coleta ($p = 0,67$), tempo de estímulo*tempo de coleta ($p = 0,71$) e frequência*tempo de estímulo*tempo coleta ($p = 0,73$) não houve associação estatística. (Os resultados são média ± desvio padrão).

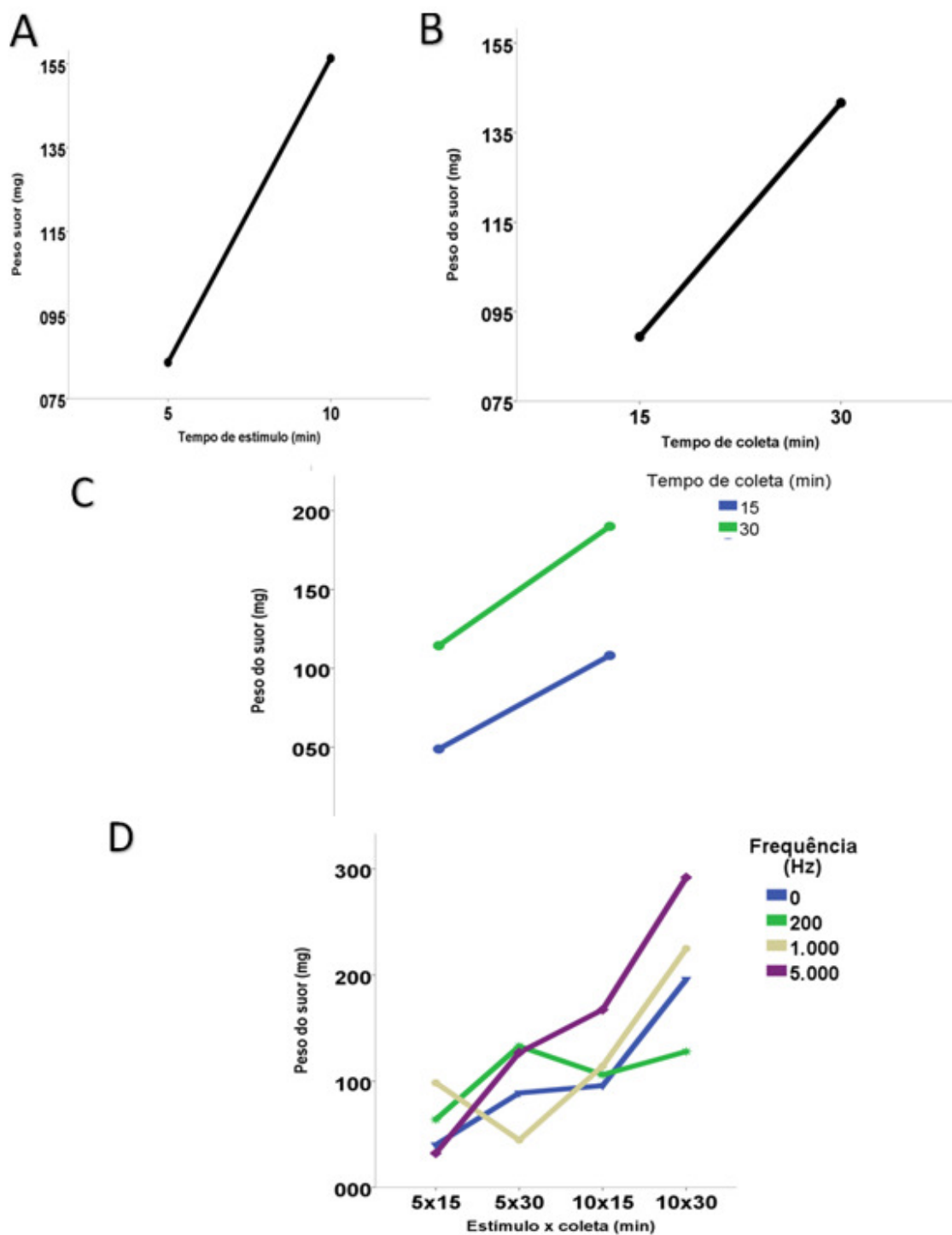


Figura 20. Associação do peso do suor com o tempo de estímulo, tempo de coleta e frequência. **A.** Variação pelo tempo de estímulo. **B.** Variação pelo tempo de coleta. **C.** Variação pelo tempo de estímulo e de coleta. **D.** Variação pelo tempo de estímulo, coleta e frequência.

A impedância da pele não foi influenciada pelo tempo de estímulo do suor ($p=0,24$), tempo de coleta de suor ($p=0,27$), interação entre tempo de estímulo e tempo de coleta ($p=0,12$). A frequência da corrente mostrou associação inversa com a impedância da pele ($p<0,0001$).

A frequência não apresentou associação com tempo de coleta ($p=0,76$), tempo de estímulo ($p=0,59$), bem como o tempo de coleta e de estímulo em conjunto ($p=0,93$)

(Tabela 7)

Tabela 7. Dados da impedância com frequências (blocos), tempo de estimulação e tempo de coleta (tratamento), com corrente fixa de 1mA.				
Frequência (Hz)	Tempo de estimulação* x tempo de coleta do suor [#]			
	10 x 30	10 x 15	5 x 30	5 x 15
0 (CCC)	7656,7 ± 363,1	7527,3 ± 3199,3	9856,1 ± 2517,7	13030,4 ± 2641,0
200 (CCP)	6765,5 ± 1271,5	5500,3 ± 697,5	5681,9 ± 1075,2	5795,6 ± 1457,4
1000 (CCP)	4822,4 ± 1280,9	3895,6 ± 117,2	4965,8 ± 613,7	4356,3 ± 882,2
5000 (CCP)	5317,9 ± 831,4	5330,1 ± 3088,6	5376,0 ± 1691,7	5873,9 ± 74,6

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz, mA, miliampere. * Na análise considerando tempo de estimulação, p -value= 0,24; # na análise considerando tempo de coleta, p -value=0,27. Para frequência ($p<0,0001$), Frequência*tempo de estimulação ($p= 0,59$), frequência*tempo de coleta ($p= 0,76$), tempo de estímulo*tempo de coleta ($p= 0,12$) e frequência*tempo de estímulo*tempo de coleta ($p= 0,93$) não houve associação estatística.

-Experimento 1 e 2:

As médias dos valores do grau de desconforto avaliados pela EVA foram baixas e não permitiram comparações entre as diferentes correntes e frequências analisadas.

A temperatura da pele antes da estimulação foi maior que após a estimulação ($p=0,0001$) **(Tabelas 8 e 9)**.

Tabela 8. Dados da frequência e da corrente em relação à temperatura da pele.

Frequência(Hz)*	Corrente [#]	Temperatura pele	Média	Desvio padrão
0 (CCC)	0,5	Antes	30,9	0,4
		Depois	29,3	1,2
	0,75	Antes	31,0	0,3
		Depois	30,6	1,5
	1	Antes	30,5	0,9
		Depois	30,4	0,7
	1,5	Antes	31,0	0,3
		Depois	30,6	1,5
	0,5	Antes	30,9	1,2
		Depois	29,6	0,4
200	0,75	Antes	31,5	3,2
		Depois	29,6	1,4
	1	Antes	31,6	2,3
		Depois	31,2	1,8
	1,5	Antes	29,4	1,8
		Depois	28,0	1,4
	0,5	Antes	31,8	0,9
		Depois	30,7	0,1
	0,75	Antes	31,3	0,8
		Depois	30,1	0,8
1000	1	Antes	30,4	2,3
		Depois	31,3	1,0
	1,5	Antes	30,8	1,0
		Depois	31,1	2,0
	0,5	Antes	31,4	1,6
		Depois	29,3	1,4
	0,75	Antes	30,2	0,8
		Depois	29,9	0,7
	1	Antes	31,6	2,1
		Depois	30,3	2,1
5000	1,5	Antes	32,8	1,5
		Depois	31,4	0,5

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz; mA, miliampere. * Na análise considerando a frequência em relação à temperatura da pele, p-value= 0,41; # Na análise considerando a corrente em relação à temperatura da pele, p-value= 0,54; para a interação entre a corrente e a frequência em relação à temperatura da pele, p-value= 0,08. Somente o efeito das avaliações foi significativo, temperatura da pele antes maior que a temperatura da pele depois, independente da corrente e da frequência, p-value< 0,0001.

Tabela 9. Dados da temperatura da pele com frequências (blocos), tempo de estimulação e tempo de coleta (tratamento), com corrente fixa de 1mA.

Frequência(Hz)*	Tempo de estímulo	Tempo de coleta	Temperatura pele	Média	Desvio padrão
0 (CCC)	10min	30 min	Antes	30,7	0,7
			Depois	30,2	0,8
		15 min	Antes	31,1	2,3
			Depois	29,2	1,6
	5min	30 min	Antes	29,6	1,4
			Depois	29,3	1,4
		15 min	Antes	31,6	1,7
			Depois	29,2	2,1
200	10min	30 min	Antes	31,3	1,1
			Depois	30,4	0,9
		15 min	Antes	32,2	1,3
			Depois	31,3	2,3
	5min	30 min	Antes	32,3	1,1
			Depois	30,5	1,0
		15 min	Antes	29,3	2,1
			Depois	28,2	3,5
1000	10min	30 min	Antes	29,8	2,1
			Depois	30,1	1,6
		15 min	Antes	31,6	2,0
			Depois	30,9	1,6
	5min	30 min	Antes	31,3	1,3
			Depois	29,6	0,5
		15 min	Antes	31,9	2,1
			Depois	30,2	1,6
5000	10min	30 min	Antes	31,2	2,8
			Depois	30,8	2,2
		15 min	Antes	33,2	3,0
			Depois	30,9	2,8
	5min	30 min	Antes	29,9	0,9
			Depois	29,1	0,3
		15 min	Antes	29,9	3,1
			Depois	29,2	2,2

CCC, corrente contínua; Hz, Hertz; mA, miliampere. * Na análise considerando a frequência em relação à temperatura da pele com o tempo de estímulo, p-value= 0,47; # Na análise considerando a frequência em relação à temperatura da pele com o tempo de coleta, p-value= 0,58. Para a interação entre frequência*tempo de estímulo*tempo de coleta, p-value= 0,47. Somente o efeito das avaliações foi significativo, temperatura da pele antes maior que a temperatura da pele depois, independente da corrente e da frequência, p-value< 0,0001.

A camada de gordura na pele, deduzida pelo IMC, não mostrou diferença estatística em relação à interação entre as correntes e frequências ($p>0,05$). A DC utilizada variou de 0,07 a 0,21mA/cm² (**Tabela 10**).

Tabela 10. Densidades de corrente (Área do eletrodo)

Correntes (mA)	Densidade de corrente (mA/cm ²)	% de indivíduos com peso do suor acima de 54mg
0,5	0,07	12/12 (100%)
0,75	0,12	12/12 (100%)
1,0	0,14	12/12 (100%)
1,5	0,21	12/12 (100%)

Todos os indivíduos saudáveis apresentaram níveis normais de Cl⁻ e Na⁺ no suor.

Pacientes com suspeita e com FC

-Experimento 3:

As mutações encontradas no gene *CFTR* para os pacientes FC estão descritas, respectivamente, nas tabelas 11 e 12.

A - mutação associada à FC; B - mutação CFTR-RD.

Tabela 11. Mutações no gene *CFTR* em indivíduos incluídos no estudo. Localização no Gene e na proteína. Classificação da mutação e sua frequência no estudo. Nomenclatura tradicional e padrão HGVS^a das mutações do gene *CFTR* também estão apresentados.

Nomenclatura tradicional	Nomenclatura HGVS ^a		Localização do gene <i>CFTR</i> ^d	Consequência	Localização proteica	Classificação da mutação	Classe funcional da mutação
	cDNA	Proteína					
F508del	c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	Exon 10	Pointdeletion	NBD1	A	II
G542X	c.1624G>T	p.Gly542X	Exon 11	Nonsense	NBD1	A	I
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp	Exon 7	Missense	TM6	A	IV
3120+1G>A	c.2988+1G>A	-	IVS16	Splicing	-	A	I
P205S	c.613C>T	p.Pro205Ser	Exon 6a	Missense	TM3	A	IV
1717-1G>A	c.1585-1G>A	-	IVS11	Splicing	-	A	I
2183AA>G	c.2051_2052delAAinsG	p.Lys684SerfsX38	Exon 13	Frameshift	RD	A	I
A561E	c.1682C>A	p.Ala561Glu	Exon 12	Missense	NBD1	A	II
3272-26A>G	c.3140-26A>G	-	IVS17b	Splicing	-	A	V
I618T	c.1853T>C	p.Ile618Thr	Exon 13	Missense	NBD1/ RD	A	IV
R1066C	c.3196C>T	p.Arg1066Cys	Exon 17b	Missense	ICL4	A	II
S549R(T>G)	c.1647T>G	p.Ser549Arg	Exon 11	Missense	NBD1	A	III
L206W	c. 617T>G	p.Leu206Trp	Exon 6a	Missense	TM3	A / B	IV
G576A	c.1727G>C	p.Gly576Ala	Exon 13	-	NBD1/ RD	B	-

^a Sequência CFTR de referência, número de acesso: NM_000492.3, o nucleotídeo número 1 corresponde ao A do códon de iniciação ATG, na sequência de referência é o número 133. Nomenclatura tradicional. (Tabela adaptada de Souza *et al.*, 2012).

Tabela 12. Genótipo das mutações no gene *CFTR* dos pacientes com FC e com suspeita de FC incluídos no estudo (n= 29)

Genótipo	Número de pacientes	%	Porcentagem acumulada
F508del/F508del	3	10.34	10.34
F508del/G542X	2	6.90	17.24
F508del/c.1717-1G>A	1	3.44	20.68
F508del/3272-26A>G	1	3.44	24.12
3120+1G>A/R1066C	1	3.44	27.56
3120+1G>A/L206W	1	3.44	31
F508del/P205S	1	3.44	34.44
F508del/R1066C	1	3.44	37.88
F508del/S549R (T>G)	1	3.44	41.32
A561E/A561E	1	3.44	44.76
G542X/2183AA>G	1	3.44	48.2
G542X/I618T	1	3.44	51.64
G542X/R334W	1	3.44	55.08
G576A/NMI	1	3.44	58.52
F508del/NMI	2	6.90	65.42
NMI/NMI	10	34.48	100

CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; N = number of patients, NMI = No mutation identified.

Tanto a CCC quanto a CCP mostraram valores de concordância com os resultados de biópsia retal e *screening* das mutações no gene *CFTR*. No entanto, o índice *Kappa* foi maior para a CCP (**Tabela 13**).

Tabela 13. Diagnóstico de Fibrose Cística pelo [Cl⁻] no suor pela corrente continua constante e corrente contínua pulsada em comparação ao diagnóstico de Fibrose Cística por sequenciamento do gene *CFTR* e pela biópsia retal.

Teste do suor	Grupos	Diagnóstico de FC*		Total	Valor p	Cohen's Kappa index	Erro Padrão	Concordância
		FC (n)	Não-FC (n)					
CCC	FC	19	5	24	0,006	0,521	0,1658	Moderado
	NFC	0	4	4				
Total		19	9	28				
CCP	FC	19	1	20	<0,001	0,922	0,1851	Quase perfeita
	Não-FC	0	9	9				
Total		19	10	29				

A CCP mostrou correlação dos níveis de cloro com a CCC (**Figura 19A**), o mesmo não ocorreu para o peso do suor (**Figura 19B**).

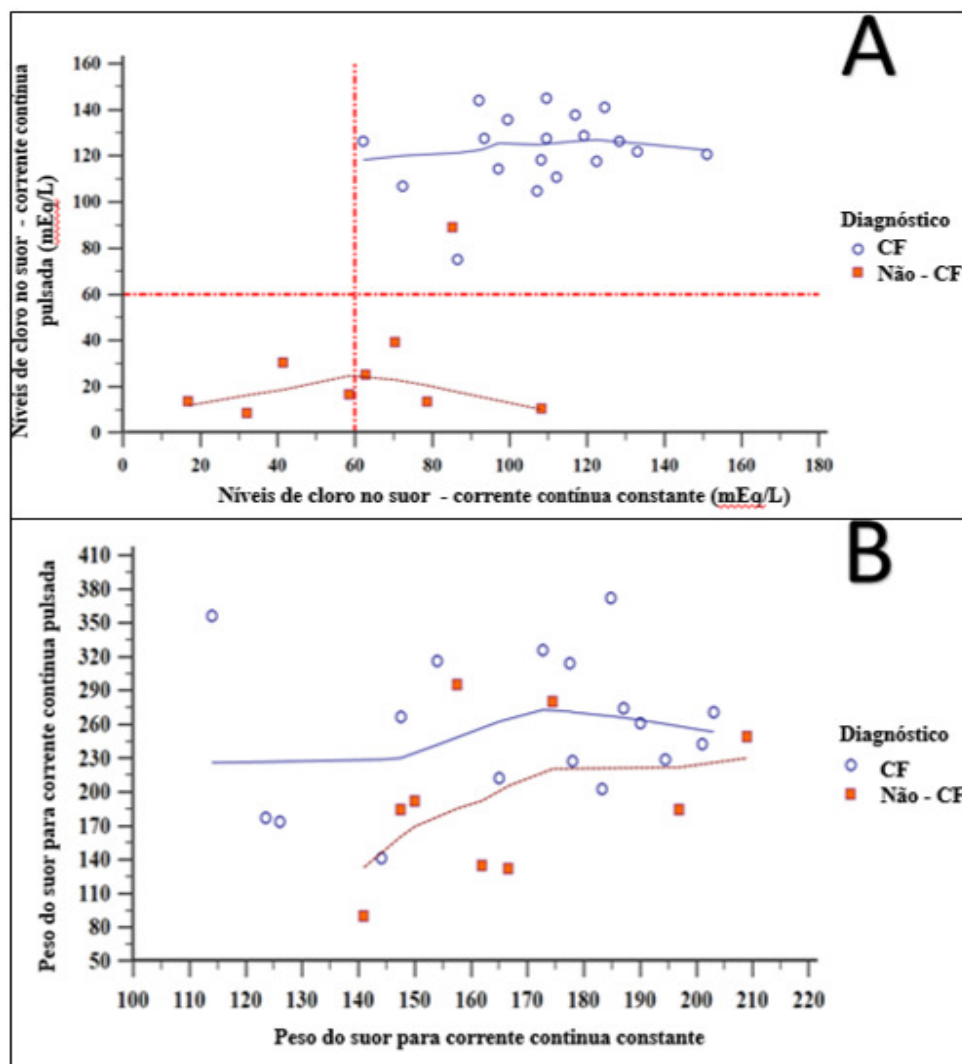


Figura 3. (A) Regressão linear para os valores de Cl^- (mEq/L) considerando as correntes contínua constante e contínua pulsada. No gráfico está apresentado o diagnóstico de fibrose cística (FC) pela triagem de mutações no gene *CFTR* e biópsia retal (cor azul). No estudo foram incluídos 28 indivíduos. O coeficiente de correlação de Spearman foi 0,704, 95% Coeficiente de Intervalo (CI): 0,449 a 0,853 ($p < 0,001$). Para o mesmo gráfico não houve associação entre os testes de Cl^- realizados [corrente contínua pulsada ($92,05 \pm 49,28$) e corrente contínua constante ($92,80 \pm 31,84$)] para os valores de cloro (mEq/L) ($p = 0,911$). Para a associação foi usado o teste T pareado e para a correlação o teste Spearman ($\alpha = 0,05$). (B) Regressão linear para o peso do suor (mg) considerando as correntes contínua constante e contínua pulsada. Nos gráficos é apresentada diagnóstico de FC pela triagem de mutações no gene *CFTR* e biópsia retal (cor azul). No estudo foram incluídos 28 indivíduos. O coeficiente de correlação de Spearman foi 0,213, 95% CI: -0,190 to 0,554 ($p = 0,30$). Para o mesmo gráfico, podemos observar valores mais elevados para o peso do suor na corrente contínua pulsada ($234,86 \pm 72,49$) que na corrente contínua direta ($167,34 \pm 25,79$) ($p = 0,001$). Para a associação foi usado o teste T pareado e para a correlação o teste Spearman ($\alpha = 0,05$).

6- DISCUSSÃO

O TSC é o padrão ouro para o diagnóstico da FC (Taylor *et al.*, 2009; Rosentein, 1998; Rosenstein & Cutting, 2006; Karezeski & Cutting, 1998; Strausbaugh & Davis, 2007; Farrell *et al.*, 2008). No entanto, estudos europeus e americanos, relatam dificuldades na realização do TSC, principalmente devido à falta de padronização do mesmo em diferentes centros de referência e laboratórios de diagnóstico para a FC (Mackay *et al.*, 2006; Cirilli *et al.*, 2008; Kirk, 2000).

Estudos sobre procedimentos de coleta e dosagem dos eletrólitos no suor são os mais abordados na literatura. Por outro lado, a estimulação, que é a primeira fase do TSC, foi pouco estudada (Gibson & Cooke, 1959; Webster, 1983).

Estudos realizados por Okabe *et al.*, (1986); Li *et al.*, (2003) e Huang & Wu (1996) indicam que iontoforese induzida por CCP não é clinicamente desconfortável, pois a despolarização entre pulsos evita que ocorra irritação epidérmica. No presente estudo, em adultos saudáveis, tanto a CCP quanto a CCC não foram irritantes. Este achado pode ser devido ao uso de baixas DC (0,14 a 0,21 mA/cm²) utilizadas para a indução do suor (Huang & Wu, 1996; Li *et al.*, 2003; Okabe *et al.*, 1986).

O uso da CCC pode resultar em polarização permanente da pele durante a estimulação, e reduzir a eficiência da administração iontoforética, proporcional ao tempo de aplicação da corrente, pelo aumento da impedância do conjunto eletrodo-pele. A acumulação desta corrente polarizada pode ser minimizada pela utilização da CCP, que é entregue periodicamente (Banga & Chien, 1988; Panzade, 2012).

Durante a fase sem estímulo, a pele fica despolarizada e depois retorna ao estado de polarização inicial após estimulação. No entanto, Bagniefski e Burnett (1990) mostraram que maior despolarização da pele pode diminuir a eficiência do transporte de drogas, se a frequência de CCP é alta (Bagniefski & Burnette, 1990). No presente estudo, mesmo frequências altas de 1000Hz e 5000Hz comparadas a frequências baixas de 0 e 200Hz foram eficazes para a entrega da pilocarpina na pele e indução do suor para a realização do TSC ($p>0,05$). Os participantes do experimento 1, 100% (48/48) obtiveram peso de suor suficiente ($> 54\text{mg}$) com o uso de baixas e de altas frequências.

O transporte de entrega da droga depende, entre outras variáveis, da duração da corrente aplicada na iontoforese (Abramowitz & Neoussikine, 1946). Os consensos recentes sobre o TSC sugerem que o tempo de 5min de estimulação seria o ideal para a estimulação da sudorese (Farrell *et al.* 2008; Castellani *et al.*, 2009; LeGrys *et al.*, 2007; Webster, 2001). No nosso estudo, o tempo de estimulação de 10min para a indução de produção de suor acima de 54mg foi melhor do que quando estimulado por apenas cinco minutos. Este fato está de acordo com o primeiro estudo da indução de suor por iontoforese (Gibson & Cooke, 1959). No presente estudo, o experimento 2, apresentou 41,6% (10/24) dos voluntários com peso de suor insuficiente ($< 54\text{mg}$) com tempo de estimulação de 5min contra 4,1% (1/24) dos indivíduos testados com tempo de estimulação de 10min ($p=0,008$). Isto significa que a quantidade de permeação da pilocarpina aumenta com o tempo de aplicação da corrente.

É sabido que o suor não deve ser coletado por mais do que 30min e não menos do que 20min (Castellani *et al.*, 2009; Beauchamp & Lands, 2005). No presente estudo, o

maior peso de suor ocorreu com 30min de coleta, preferencialmente com DC de 0,14 e 0,21 mA/cm².

Estudos com CCP demonstraram que a forma de onda influencia na permeação da droga sobre a pele. Chen & Chien (1996) estudaram a absorção do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) utilizando CCC (0,764mA/cm²) e CCP (0,764mA/cm² e 1kHz) com diferentes formas de ondas. Concluíram que as formas de ondas senoidal e retangulares foram iguais a CCC no fluxo de permeação do hormônio; e que o fluxo causado por formas de ondas triangulares foi inferior quando comparada com a CCC. Chien e colaboradores (1989) mostraram que o fluxo da permeação da droga estudada foi eficiente com as formas de ondas senoidal, trapezoidal e retangular (0,33mA/cm² e 2 kHz). De acordo com os autores citados anteriormente, Hirvonen (1995) relatou que a permeabilidade de aminoácidos na pele (lisina e ácido glutâmico) utilizando DC de 0,5mA/cm² e frequência de 2,5kHz foram iguais nas formas de ondas retangular e senoidal. Kanebako (2002) demonstrou que a permeabilidade da droga testada foi melhor com o uso de CCP utilizando frequências inferiores a 100Hz e forma de onda retangular e senoidal.

Por outro lado, a forma de onda quadrada foi testada no estudo de Panzade *et al.*, (2012) para entrega da droga granisetron, por iontoforese, onde a CCC mostrou ser mais eficiente em promover a permeação da droga. O aumento de eficiência da CCC sobre a CCP pode ser explicado pelo fato de que a quantidade de carga elétrica de permeação pela pele é reduzida pela metade, em função da CCP de onda quadrada. No entanto, a CCP foi considerada menos prejudicial para a pele.

Em contrapartida, diferentemente dos estudos anteriores, nosso estudo utilizou forma de onda triangular na CCP e valores menores das correntes. Com o método utilizado obtivemos pesos adequados de suor para o TSC, caracterizando um procedimento útil com a utilização da CCP com formato de onda triangular para o estímulo da sudorese. Este achado deve constituir um fato significativo de benefícios, principalmente, em lactentes e crianças, onde ainda a CCP não foi testada.

O cálculo da dose de corrente aplicada sobre a pele do indivíduo é conhecida como DC, que é determinada pelo tamanho do eletrodo que deve ser compatível com a área alvo. Eventualmente, cálculos errados da DC, podem ocasionar, aos pacientes, riscos de irritação da pele e até queimaduras. A DC de $0,5\text{mA}/\text{cm}^2$ foi descrita como a máxima tolerável pelo homem (Banga & Chien, 1988; Panzade *et al.*, 2012; Chiang *et al.*, 1998; Van der Geest *et al.*, 1997).

À medida que a DC aumenta, o fluxo de permeação da droga também aumenta. A quantidade cumulativa permeada para $0,5\text{mA}/\text{cm}^2$ na CCC mostrou ser 3,8 vezes maior quando comparada com a CCP na permeação da droga no estudo de Panzade *et al.*, (2012). Isto pode ser atribuído ao fato de que um aumento na DC pode causar aumento no transporte da droga pelos poros da pele.

Nos estudos de indução de suor com pilocarpina, publicados na literatura médica, nós não conseguimos identificar os valores de DC. O único *guideline* que sugere valores de DC para o TSC foi descrito em 2000 (NCCLS), com valores de $0,16$ a $0,24\text{mA}/\text{cm}^2$.

No nosso estudo, DC entre 0,14 a 0,21mA/cm² foram eficientes para o transporte de pilocarpina na pele por iontoforese, induzindo a estimulação do suor em 100% dos casos quando estimulados durante 10min e coletados com 30min.

Entre as desvantagens do transporte de drogas por iontoforese, estão os riscos de choques e queimaduras devido ao uso de correntes elétricas elevadas e por longos períodos. Estes podem ocorrer por fatores como, por exemplo, o contato dos eletrodos com a pele, a super dosagem, a presença de lesões no local de aplicação, as alterações significativas de pH e as elevadas intensidades de corrente (Kalia *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, nenhum sujeito apresentou efeitos colaterais significativos. Este fato deveu-se à baixa DC empregada com onda triangular. Portanto, nosso estudo foi seguro, sem efeitos colaterais causados pela estimulação elétrica como, por exemplo, queimaduras da pele.

As propriedades bioelétricas da pele permitem a aplicação de diversas modalidades de corrente elétrica. A oposição oferecida pelos tecidos biológicos é denominada impedância, presente no fluido inter e extracelular, e da reatância capacitiva das membranas celulares. Para ocorrer absorção da droga na pele, a corrente elétrica deve vencer a impedância imposta ao seu fluxo e atingir o tecido alvo com intensidade suficiente (Bolfe *et al.*, 2007; Kyle *et al.*, 2004).

A pele possui impedância relativamente alta, está associada principalmente ao estrato córneo (Barry, 2002; Pikal, 1992). Durante a iontoforese, a resistência da pele diminui e a concentração de íons no estrato córneo aumenta, permitindo a permeabilidade

da droga durante a passagem da corrente elétrica. Ao final do fluxo de corrente, a concentração dos íons no local retorna aos níveis fisiológicos normais (Curdy *et al.*, 2002). Não há evidências de que a amplitude e a duração da corrente estarão associadas à diminuição temporária da impedância e que, estes fatores, causem diminuição do efeito barreira da pele (Ulreich *et al.*, 1996). No presente estudo, com os tempos utilizados de 5 e 10min, não foram observadas variações nos valores da impedância no sistema pele-gaze-eletrodo ($p>0,05$).

O tecido adiposo é mal condutor da corrente elétrica, ocasionando aumento da impedância. Embora numerosos estudos relatem que frequências altas ou baixas não influenciam na diminuição da impedância da pele (Bagniefski & Burnette, 1990; Kanebako *et al.*, 2002; Nakakura *et al.*, 1996). Chien e colaboradores, (1989) relataram que com o aumento da frequência do estímulo obtém-se menor impedância para a pele, o que concorda com nosso estudo onde CCP, com frequências de 1000Hz, ocasionou menor impedância do conjunto pele-gaze-eletrodo proporcionando produção de suor adequada. Porém, os indivíduos testados não apresentaram IMC elevados para impedir a permeação da pilocarpina e reduzir a produção de suor ($p>0,05$).

A corrente elétrica segue o caminho de menor oposição, sendo assim, a impedância da pele determinará a sua intensidade, densidade e o trajeto, podendo alterar as respostas biológicas por ela desencadeadas. A impedância da pele se altera com a distância intereletrodos, o posicionamento, a localização do campo elétrico, a variação do comprimento, com a quantidade de água e o número de camadas do estrato córneo, sendo a

queratina, a principal barreira à passagem da corrente elétrica (Sagi-Dolev *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1998; Chizmadzhev *et al.*, 1998; Ya-Xian *et al.*, 1999).

O posicionamento dos eletrodos também altera a DC. Quanto maior a distância entre os eletrodos, menor a DC nos tecidos. O fluxo de corrente prefere as vias com baixa impedância, portanto a distância intereletrodos pode aumentar o caminho para a passagem da corrente podendo dispersar em seu trajeto entre os eletrodos quando a distância aumenta (Nelson *et al.*, 1999; Low & Reed, 2000; Cameron, 1999). A distância adotada intereletrodos neste estudo foi de 5cm a qual foi adequada para a estimulação do suor.

A temperatura ambiente do ar da sala onde foram realizados os experimentos foi controlada em 25°C, devido à influência do aumento da temperatura ambiente levar a diminuição do nível de hidratação da queratina e a espessura do tecido biológico influenciar no aumento da impedância cutânea (Kubisz, 2001).

O aumento de temperatura no eletrodo é proporcional ao quadrado da DC (Nelson *et al.*, 1999). Nós avaliamos esse efeito aferindo a temperatura da pele no local de contato dos eletrodos antes e pós-estimulação. Foi observado que a DC aplicada não ocasionou o aquecimento dos eletrodos, e não foram observadas queimaduras no local estimulado ($p < 0,001$).

Atualmente, com a necessidade da realização do TSC, cada vez mais frequente e precoce, devido à implantação da TNN em nosso país, acreditamos que a utilização de CCP possa constituir um benefício para lactentes no primeiro ano de vida, devido ao baixo risco

apresentado. Demonstramos que maiores tempos de estímulo e coleta favorecem a obtenção de maiores pesos de suor.

Para melhor avaliação da CCP, realizamos o experimento 3 em pacientes com suspeita e com FC em acompanhamento no nosso Centro de Referência, que apresentavam exames complementares de biópsia retal e estudos das mutações do gene *CFTR*, bem como dois ou mais TSC estimulados pela CCC. A CCP mostrou melhor associação com os outros exames de diagnósticos do que a CCC, respectivamente, 96,6% (28/29) e 82,1% (23/28).

Nas últimas décadas, numerosos avanços nos conhecimentos genético e molecular da FC têm possibilitado melhor entendimento fisiopatológico, conhecimento sobre a variabilidade clínica e possibilidades de manejo personalizado.

Em contrapartida, os avanços na fisiopatologia, têm mostrado a presença de formas não clássicas da FC, surpreendendo pesquisadores da área que se defronta com um novo desafio: como diagnosticar pacientes até então desconhecidos com FC?

Mesmo com todo conhecimento atual sobre a FC e para o seu diagnóstico, nossa ferramenta básica, primordial e histórica, ainda é o TSC, considerado padrão ouro. A correta realização deste exame propicia o diagnóstico das formas clássicas (mutações de classes I, II e III e IV) e, em muitos pacientes com formas não clássicas (classes IV, V e VI).

Esforços para padronizar, viabilizar e melhorar as etapas do TSC poderá permitir um menor gasto financeiro, maior consistência no diagnóstico, estudos multicêntricos

padronizados, maior confiabilidade nos resultados e perspectivas de novos estudos, principalmente, para populações restritas como recém nascidos, idosos e pacientes com formas não clássicas da FC.

Ressalta-se que para nossa população, ainda é restrito o diagnóstico da FC por outros métodos, como o sequenciamento do gene *CFTR*, evaporímetro, diferença de potencial nasal e/ou biópsia retal. Sabemos que estes métodos são complementares e que sendo realizado, o TSC, continua sendo o padrão-ouro para diagnóstico da FC.

Nosso estudo mostra que apesar do TSC ser amplamente utilizado e aplicado no diagnóstico de pacientes com FC, ainda constitui um campo de estudos para avaliar e maximizar a eficácia e a efetividade das etapas de estimulação e coleta. Particularmente para a etapa de estimulação que tem sido muito pouco estudada.

7- CONCLUSÃO

A realização do TSC, tanto com CCC quanto CCP, utilizando DC de 0,14 a 0,21 mA/cm² mostrou eficácia na estimulação e promoveu produção de suor e peso de suor adequados para a análise dos eletrólitos.

O tempo ideal de estimulação e coleta de suor foram, respectivamente, 10 e 30min.

Obtivemos menor impedância do conjunto pele-gaze-eletrodo na CCP com a frequência de 1000Hz.

Os testes utilizando CCC e CCP não apresentaram efeitos colaterais.

O uso da CCP no TSC mostrou maior concordância na comparação com os exames de biópsia retal e com os estudos das mutações do gene *CFTR* do que a CCC.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramowitz D, Neoussikine B. Treatment by Ion Transfer. New York: Grune and Stratton; 1946. p. 87.

Bagniefski T, Burnette RR. A comparison of pulsed and continuous current iontophoresis. J Control Rel. 1990; 11:113-122.

Banga AK, Chien YW. Iontophoretic delivery of drugs: fundamentals, developments and biomedical application. J Control Rel. 1988; 7:1.

Barben J, Casaulta C, Spinas R, Schöni MH. Sweat testing practice in Swiss hospitals. Swiss Med Wkly. 2007;137:192-8.

Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. Adv. Drug Deliv Rev 2002; 54:S31-S40.

Barth LR. Perfil microbiológico e indicadores de gravidade em pacientes com fibrose cística. [thesis]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Beauchamp M, Grey V, Lands LC. Sweat collection for testing in Canadian cystic fibrosis centers: is it optimal? Clin Biochem. 2005;38:934-7.

Beauchamp M, Lands LC. Sweat-Testing: A Review of Current Technical Requirements. Pediatr Pulmonol. 2005; 39:507–511.

Bolfe VJ, Ribas SI, Montebelo MIL, Guirro RRJ. Comportamento da impedância elétrica dos tecidos biológicos durante a estimulação elétrica transcutânea. Rev Bras Fisioter. 2007; 11(2):153-159.

Cameron MH. Physical agents in rehabilitation: from research to practice. Philadelphia: W.B.Saunderscompany; 1999.

Carlsson AM. Assessment of chronic pain. I. Aspects of the reliability and validity of the visual analogue scale. Pain. 1983; 16(1):87-101.

Castellani C, Southern KW, Brownlee K, *et al.* European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. J Cyst Fibros. 2009; 8:153-173.

Castellani C, Conway S, Smyth AR, Stern M, Elborn JS. Standards of Care for Cystic Fibrosis ten years later. J Cyst Fibros. 2014;13(1):S1-2.

Chen LLH, Chien YW. Transdermal iontophoretic permeation of luteinizing hormone releasing hormone: characterization of electric parameters. *J Control. Rel.* 1996; 40: 187-198

Chiang CH, Shao CH, Chen JL. Effects of pH electric current, and enzyme inhibitors on iontophoresis of delta sleep-inducing peptide. *Drug Dev. Ind Pharm.* 1998; 24:431-8.

Chien YW, Siddiqui O, Shi WM, Lelawongs P, Liu JC. Direct current iontophoretic transdermal delivery of peptide and protein drugs. *J Pharm Sci.* 1989, 78, 376-83.

Chizmadzhev YA, Kuzmin PI, Weaver JC, Potts RO. Skin appendageal macropores as a possible pat way for electrical current. *J Investg Dermatol Symp Proc.* 1998; 3(2):148-52.

Cirilli N, Podan R, Raia V. Audit of sweat testing: A first report from Italian cystic fibrosis centres. *J Cyst Fibros.* 2008; 7:415-422.

Collie JTB, Massie RJ, Jones OAH, LeGrys VA, Greaves RF. Sixty-Five Years Since the New York Heat Wave: Advances in Sweat Testing for Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2014; 49:106–117.

Curdy C, Kalia YN, Guy RH. Post-iontophoresis recovery of human skin impedance in vivo. *Eur J Pharm Biopharm.* 2002; 53:15-21.

Di Sant' Agnese PA, Darling RC, Perara GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Dis Child.* 1953; 86(5):618-9.

Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:267-82.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, *et al.* Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr* 2008; 153:S4-14.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatr.* 1959; 23(3):545-549.

Gonçalves AC, Marson FAL, Mendonça RMH, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Paschoal IA, Levy CE. Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis. *Diagn Pathol.* 2013, 8:46.

Gonska T, Choi P, Stepheson A, Ellis L, Martin S, Solomon M, Dupuis A, Dorfman R, Zielenski J, Ooi CY, *et al.* Role of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in patients with chronic sinopulmonary disease. *Chest.* 2012; Epub ahead of print.

Gonska T, Ip W, Turner D, Han WS, Rose J, Durie P, Quinton P. Sweat gland bioelectrics differ in cystic fibrosis: a new concept for potential diagnosis and assessment of CFTR function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2009; 64:932-938.

Green A. Guidelines for the performance of the sweat test for the investigation of cystic fibrosis in the UK. Available from URL: [http:// www.acb.org](http://www.acb.org) [accessed 30 November 2005].

Gussow NSM. *Eletricidade Básica*. São Paulo: Mc Graw-Hill 1985, p.24-178.

Gutmann AZ. *Fisioterapia actual*. 2 ed, Barcelona, ed. Jims 1980; p.5-161.

Haardt, M, Benharouga, M, Lechardeur, D, Kartner, N, Lukacs, GL. (1999). C-terminal Truncation Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. *J Biol Chem*. 274(31), 21873-7.

Hammond KB, Nelson L, Gibson LE. Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1994; 124:255-60.

Hirvonen J, Hueber F, Guy RH. Current profile regulates iontophoretic delivery of amino acids across the skin. *J Control Rel*. 1995; 37:239-249.

Huang YiY., Wu SM. Transdermal Iontophoretic Delivery of Thyrotropin-Releasing Hormone Across Excised Rabbit Pinna Skin *Drug Dev. Ind Pharm*. 1996; 22(11):1075-81.

Jakobsson BM, Salomonsson S, Hjelte L. Sweat test in Sweden 2002 - a cross sectional study. *J Cyst Fibros*. 2004; (Suppl 1):E441.

Johnson LR. *Gastrointestinal physiology*. Capitulo 7- Salivary secretion. 5^a ed. USA Elsevier. 1997, 59-67.

Kalia YN, Naik N, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Ver*. 2004;56(5):619-58.

Kanebako M, Inagi T. Takayama K: Transdermal delivery of iondomethacin by iontophoresis. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25:779-82.

Karezeski B, Cutting G. Diagnosis of cystic fibrosis. CFTR-related disease and screening. *Prog Respir Res*. 2006; 34:69-76.

Kirk JM; Keston M, McIntosh I, al Essa S. Variation of sweat sodium and chloride with age in cystic fibrosis and normal populations: further investigations in equivocal cases. *Ann Clin Biochem*. 1992; 29:145-52.

Kirk JM. Inconsistencies in sweat testing in UK laboratories. *Arch Dis Child*. 2000; 82:425-427.

Knoblauch P, Moll F. In vitro pulsatile and continuous transdermal delivery of buserelin by iontophoresis. *J Control Rel*. 1993; 26(3):203-212.

Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? *N Engl J Med*. 2002; 347:439-442.

Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(12):a009548.

Kubisz L. The influence of storage time on the temperature dependence of the dc electrical conductivity of horn keratin. *Bioelectroch*. 2001; 53(2):161-4.

Kyle UG, Bosaeu I, De Lorenzo AD, Deurenberg P, Elia M, Gómez JM, *et al*. Bioelectrical impedance analysis-part I: review of principles and methods. *Clin Nutr*. 2004; 23(5):1226-43.

LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ, Jr. Diagnosticsweat testing: The CysticFibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr*. 2007;151:85-89.

LeGrys VA. Assessment of sweat-testing practicesfor the dignosis of cystic fibrosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125:1420-4.

LeGrys VA. Sweat analysis proficiency testing for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2000;30(6):476-80.

LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis. Practical considerations. *The J Pediatr*. 1996; 129:6.

Li SK, Higuchi WI, Zhu H, Kern SE, Miller DJ, Hastings MS. In vitro and in vivo comparisons of constant resistance AC iontophoresis and DC iontophoresis. *J Control Rel*. 2003; 91:327-343.

Licht S. Electrodiagnóstico y electromiografía. Barcelona, ed. Jims. 1970; p.10-183.

Low J, Reed A. Electrotherapy explained: principlesand practice. Oxford: Butterworth-Heinemann. 2000.

Mackay R, George P, Kirk J. Sweat testing for cystic fibrosis: A review of New Zealand laboratories. *J Paediatr Child H*. 2006; 42:160-164.

Mattar ACV, Gomes EN, Adde FV, Leone C, Rodrigues Joaquim. Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2010; 86(2):109-14.

Millman J, Taub H. Pulse, digital, and switching waveforms. New York: McGraw-Hill Book Company 1965. p.64-109.

Misch KA, Holden HM. Sweat test for diagnosis of fibrocystic disease of the pancreas. *Arch Dis Child* 1958; 33:179-180.

Mishra A, Greaves R, Massie J. The limitations of sweat electrolyte reference intervals for the diagnosis of cystic fibrosis: a systematic review. *Clin Biochem Rev* 2007; 28:60-76.

MS Brasil. Portaria Nº 288, 21 de Março de 2013. Diário oficial da união, Brasília, Nº 56 – DOU – 22/03/13 – seção 1 – p.47. Disponível em URL: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpssp/bibliote/informe_eletronico/2013/iels.mar.13/Iels55/U_PT-MS-SAS-288_210313.pdf.

Naehrlich L. Sweat testing practices in German cystic fibrosis centers. *Klim Padiatr*. 2007; 219(2):70-3.

Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L, van Konigsbruggen-Rietschel S, Leal T, Melotti P, Middleton P, Tummler B, Vermeulen F, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: An international survey. *J Cyst Fibros*. 2014; 13:24-8.

Nakakura M, Kato Y, Hayakawa E, Kuroda T. Effect of pulse on iontophoretic delivery of desmopressin acetate in rats. *Biol Pharm Bull*. 1996; 19:738-40.

NCCLS. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis; Approved Guideline. East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085: NCCLS; 1994.

NCCLS. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Analysis; Approved Guideline, 2nd edn. NCCLS document C34-A2. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2005.

Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. Clinical electrotherapy. 3a. ed. Stanford: Appleton & Lange. 1999. p. 15-54.

Nelson RM, Hayes KW, Currier DP. Eletroterapia clínica. Barueri: Manole 2003. p55-143.

Numajiri S, Sakurai H, Sugibayashi K, Morimoto Y, Omiya H, Takenaka H, Akiyama N. *J. Pharm. Pharmacol*. 1993; 45:610-613.

Okabe K, Yamaguchi H, Kawai Y. New iontophoretic transdermal administration of the beta-blocker metoprolol. *J Control Rel*. 1986; 4:79–85.

Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, Freedman SD, Zielenski J, Berthiaume Y, Corey M, *et al.* Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology*. 2011; 140:153-161.

Panzade P, Heda A, Puranik P, Patni M, Mogal V. Enhanced Transdermal Delivery of Granisetron by Using Iontophoresis. *IJPR*. 2012; 11(2):503-512.

Phipps JB, Padmanabhan RB, Lattin GA. Iontophoretic delivery of model inorganic and drug ions. *J Pharm Sci*. 1989; 48:365.

Pikal MJ. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Adv Drug Deliv Rev*. 1992; 9:201-237.

Pr  at V, Thysman S. Transdermal iontophoretic delivery of sufentanil. *Int J Pharm*. 1993; 96:189-196.

Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, Conrad D, Shamsuddin AK, Durie P, Gonska T. β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186(8):732-9.

Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983; 301:421-2.

Quinton PM. Cystic fibrosis: lesson from the sweat gland. *Physiol (Bethesda)*. 2007; 22:212-225.

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

Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998; 132(4):589-95.

Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med*. 1998; 19(3):423-41.

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(19):1992-2001.

Sabbahi MA, Costello CT, Ernran A. A method for reducing skin irritation by iontophoresis. *Phys Ther*. 1994, 74:S156.

Sagi-Dolev AM, Prutchi D, Nathan RH. Three-dimensional current density distribution under surface stimulation electrodes. *Med Biol Eng Comp*. 1995; 33:403-8.

Schales O, Schales SS. A simple and accurate method for determination of chloride in biological fluids. *J Biol Chem*. 1941; 140:879.

Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D. Recommandations Françaises pour la Réalisation et l'Interprétation du Test de la Sueur dans le Cadre du Dépistage Néonatal de la Mucoviscidose. Arch Fr Pediatr. 2010; 17:1349-1358.

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

Rowe SM, Stanley MBS, Sorscher J. Cystic Fibrosis – Mechanism of Diseases. New Engl J Med. 2005; 352:1992-2001.

Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. Clin Chest Med. 2007; 28(2):279-288.

Su MH, Srinivasan V, Ghanem AH, Higuchi WI. Quantitative in vivo iontophoretic studies. J Pharm Sci. 1994; 83:12-17.

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

Ulreich A, Leibrecht W, Promer M, Kullich W. Infiltration versus iontophoresis in case of epicondylitis. A comparative study. Phys Med Rehab Kuror. 1996; 6:183-185.

Van der Geest R, Banhof M, Bodde HE. Iontophoretic delivery of apomorphine I. In-vitro optimization and validation. Pharm Res. 1997; 14:1798-1803.

Webb BW, Flute PT, Smith MJH. The electrolyte content of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. Arch Dis Child. 1957; 32:82-84.

Webster HL. A clinical appraisal of cystic fibrosis sweat-testing guidelines. Am Clin Lab. 2001; 20:39-42.

Webster, H.L. Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. CRC Crit Rev in Clin Lab Sci. 1983; 18:313-338.

Weiler CA, Drumm ML. Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. Front Pharmacol. 2013; 23:4-40.

Wescor Inc. <http://www.wescor.com/biomedical/cysticfibrosis/macrodut.html>.

WHO (2000). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization Technical Support Series, 894. Geneva: World Health Organization.

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

Ya-Xian, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin-relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291:555-9.

Zakzewski CA, Amory DW, Jasaitis DK, Li JK. Iontophoretically enhanced transdermal delivery of an ACE inhibitor in induced hypertensive rabbits: preliminary report. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1992; 6(6):589-95.

Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*. 1995; 29:777-807.

Zhu F, Scheditz D, Levin NW. Estimation of trunk extracellular volume by bioimpedance. *Conf. Proc IEEE. Eng Med Biol Soc*. 1998; 20(6):3104-7.

9- ANEXOS

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: **AValiação das Correntes Contínua Pulsada e da Contínua Constante pelo Método de Iontoforese por Pilocarpina em indivíduos com e sem Fibrose Cística.**

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Eu _____, (pai ou responsável), portador do RG _____ telefone _____ residente na _____ rua _____ bairro _____ cidade _____ por livre espontânea vontade permito a participação de _____ (nome da criança).

Este projeto investiga a corrente pulsada, corrente responsável por estimular a produção de suor na pele da pessoa.

O teste do suor é um exame feito para o diagnóstico da Fibrose Cística. O teste consiste: na estimulação do suor através de uma corrente elétrica por 10 minutos, na coleta do suor produzido por até 30 minutos e na análise da concentração de cloro e sódio no suor coletado. Os riscos de dor, formigamento, queimadura e irritação local durante o teste são mínimos, já que o aumento da corrente será feito de forma gradual respeitando o limite relatado pelo paciente e a pele do paciente será protegida.

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

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

Autorizo a aplicação desta avaliação e depois, poderei ser comunicado sobre os resultados, como retribuição por esta prestação de serviço. Sei que em qualquer parte deste estudo poderei ter acesso aos pesquisadores desta pesquisa para resolver qualquer dúvida. Além disso, sei que receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por mim assinado.

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

Assinatura do Responsável

Pesquisadores Responsáveis:

Carla Cristina Souza Gomez

Telefone: 19- 3521 8983

Prof.Dr. José Dirceu Ribeiro

Telefone: 19-3521 8983

Em caso de denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 19-35217187.

Anexo 2: Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP (Campus Campinas)

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da corrente pulsada pelo método de iontoforese por pilocarpina em pacientes com fibrose cística.

Área Temática:

Pesquisador: CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ

Versão: 2

Instituição: Hospital de Clínicas - UNICAMP

CAAE: 05484412.8.0000.5404

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 80430

Data da Relatoria: 10/08/2012

Apresentação do Projeto:

Desenho do estudo: será experimental com a intervenção em indivíduos com e sem FC acompanhados no Ambulatório de FC do HC/FCM/UNICAMP. Tamanho Amostral: serão avaliados 160 pacientes com e sem FC em acompanhamento no Ambulatório de FC do HC/UNICAMP, 7 anos a 20 anos de idade. Os voluntários serão divididos nos seguintes grupos: a) 7 a 10 anos - N = 40 sendo 20 com FC e 20 sem FC b) 11 a 14 anos - N = 40 sendo 20 com FC e 20 sem FC c) 15 a 17 anos - N = 40 sendo 20 com FC e 20 sem FC d) 18 a 20 anos - N = 40 sendo 20 com FC e 20 sem FC. Variáveis Estudadas: As variáveis estudadas serão analisadas através de dados coletados por um novo dispositivo indutor de sudorese pelo método de iontoforese por pilocarpina já criado em nosso laboratório. O procedimento iniciará com a limpeza da pele do antebraço com água destilada e secagem com gaze, os eletrodos utilizados na pesquisa serão de latão com 30mm que serão fixados por meio de presilhas, sobre a gaze embebida em solução de nitrato de pilocarpina (eletrodo positivo) e ácido sulfúrico 0,004 N (eletrodo negativo). Este procedimento será dividido em duas etapas, a primeira etapa será realizada um grupo controle com 15 indivíduos sem FC variando a intensidade da corrente contínua constante e da corrente contínua pulsada (100 a 5000 Hz). A corrente contínua constante será aplicada em um antebraço e a corrente contínua pulsada no outro antebraço do paciente uma de cada vez a fim de encontrar a intensidade que gere menos desconforto e produza maior quantidade de suor e a segunda etapa será realizada em 160 pacientes com e sem FC com uma intensidade pré estabelecida no grupo controle durante uma estimulação de 10 minutos para ambas as correntes estudadas. Ao término da estimulação elétrica a pele será novamente limpa com água destilada e seca com gaze para colocação do papel de filtro de cerca de 5 cm de diâmetro coberto com plástico e atadura de crepe. O papel filtro será retirado com uma pinça quando estiver totalmente saturado de suor e será anotado o tempo da coleta, posteriormente o papel será pesado em balança digital para averiguação da massa do suor. Em seguida, o papel será colocado em um vidro com tampa junto à água destilada e vedado com plástico para ser encaminhado para a análise laboratorial do sódio e do cloro. A concentração de cloro será medida através de titulação de cloro e a concentração de sódio será determinada pelo fotômetro de chama (resultados em mmol/L) (Anexo 1) A avaliação do desconforto será realizada através de uma escala visual analógica-EVA21 onde o paciente será questionado quanto ao seu grau de desconforto sendo que 0 significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máxima suportável pelo paciente (ANEXO 2). Seleção dos Sujeitos: Os indivíduos deste estudo serão pacientes com e sem FC acompanhados pelo Ambulatório de FC do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo primário do presente estudo é avaliar se a corrente contínua pulsada do novo dispositivo de indução de sudorese desenvolvido pelo setor de engenharia da UNICAMP será capaz de fornecer quantidade adequada de suor que permita dosar os níveis de sódio e cloro neste fluido, comparar os efeitos colaterais da corrente contínua constante e da corrente contínua pulsada em pacientes com FC acompanhados no Departamento de FC do HC/UNICAMP.

Objetivo Secundário: Avaliar a quantidade de suor produzida pelos dois tipos de correntes elétricas aplicadas. Avaliar o grau de desconforto dos indivíduos em função da frequência e intensidade da corrente aplicada em relação a idade e gênero. Avaliar se há diferença na sudorese e nos níveis de sódio e cloro nas diferentes mutações da FC. Comparar os efeitos colaterais entre o método tradicional (corrente contínua constante) e o novo método (corrente contínua pulsada). Dosar a

quantidade de sódio e cloro no suor obtidos pelo novo dispositivo padronizado pelo setor de engenharia da UNICAMP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A coleta dos dados desta pesquisa será efetuada a partir da fixação de dois eletrodos no antebraço do paciente ligada ao dispositivo de indução da sudorese. Os riscos associados a esta avaliação incluem dor, formigamento e eritema da pele que será interrompida naqueles pacientes que apresentarem dificuldade durante o procedimento. Os riscos associados à dor em formigamento serão mínimos, uma vez que serão relatados pelos pacientes o limite máximo de corrente suportável e para minimizar este desconforto será abaixada a corrente até sua tolerância suportável. Para minimizar possíveis riscos de queimaduras na pele serão utilizados gases umedecidos com Pilocarpina e Ácido Sulfúrico em uma porcentagem totalmente segura técnica já amplamente utilizada em todo o mundo. A coleta será interrompida se o paciente apresentar qualquer um destes desconfortos e riscos. Os pais ou responsáveis estarão presentes durante toda a realização do exame. **Benefícios:** Os benefícios oferecidos por esta pesquisa são aplicáveis a toda comunidade científica, por meio da publicação e divulgação dos resultados, tomando possível identificar a menor intensidade de corrente elétrica e respectiva frequência de acordo com a impedância da pele dos pacientes, permitir que a estimulação elétrica de sudorese pelo método de iontoforese por pilocarpina seja menos desconfortável e favorecer o diagnóstico para pacientes com fibrose cística.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Projeto de pesquisa tem uma boa elaboração contendo os seguintes Critérios de Inclusão e Exclusão:
Critério de Inclusão: Farão parte desse estudo, pacientes com e sem FC em acompanhamento pelo Ambulatório de FC do HC/UNICAMP com idades entre 7 e 20 anos.
Critério de Exclusão: Serão excluídos desse estudo os pacientes que apresentarem alergia a pilocarpina ou ao ácido sulfúrico e eritemas durante a realização do teste.
Apresenta Bibliografia, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Orçamento no valor Total de R\$ 11.132,60.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto de Pesquisa apresenta todos os Termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado após resposta a pendências.

Anexo 3 - Ficha de dados e dosagem do suor

TESTE DO SUOR PARA DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA: COMPARAÇÃO DA CORRENTE CONTÍNUA CONSTANTE COM A CORRENTE CONTÍNUA PULSADA

Paciente: _____

RG: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade (anos e meses): _____

Sexo: M() F()

Ascendência:

Mãe: () europeia () africana () asiática () indígena e () outros _____

Pai : () europeia () africana () asiática () indígena e () outros _____

Raça:

Branca (), Pardo (), Negro () e Oriental ()

Diagnóstico: _____

Resultados do teste de Suor

1) Corrente contínua constante

Na: _____ mmol/l Massa do suor: _____ (mg) Cl: _____ mmol/l

2) Corrente contínua pulsada

Na: _____ mmol/l Massa do suor: _____ (mg) Cl: _____ mmol/l

Anexo 4- Avaliação do Desconforto a Estimulação Elétrica

Avaliação do Desconforto a Estimulação Elétrica

Paciente: _____

RG: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade (anos e meses): _____

Sexo: M() F()

Altura: _____ Peso: _____ IMC: _____

Etnia: Branca (), Pardo (), Negro () e Oriental ()



L

ANALÓGICA - EVA

1) Braço direito:

Tipo da corrente: _____ corrente: _____ frequência: _____ tempo de estimulação: _____
tempo de coleta _____

análise do desconforto:

1': _____ descrição do
desconforto: _____

5': _____ descrição do
desconforto: _____

10': _____ descrição do
desconforto: _____

2) Braço esquerdo:

Tipo da corrente: _____ corrente: _____ frequência: _____ tempo de estimulação: _____
tempo de coleta _____

análise do desconforto:

1': _____ descrição do
desconforto: _____

5': _____ descrição do
desconforto: _____

10': _____ descrição do desconforto: _____

10- APÊNDICES

Apêndice 1- Histórico Escolar



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Diretoria Acadêmica



Histórico Escolar

Nome		Registro Acadêmico	
Carla Cristina Souza Gomez		106353	
Documento de Identidade	CPF	Nascimento	Sexo
40348000-0-SP	353.967.538-89	08/10/1985	Feminino
Naturalidade		Nacionalidade	
Franca - SP		Brasileira	

Dados do Ingresso		Nível
Curso: 44 - Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente		Mestrado
Área de Concentração		
AB - Saúde da Criança e do Adolescente Reconhecido pela Portaria MEC nº 1077 de 31/08/2012		
Forma de Ingresso		Mês/Ano de Ingresso
Exame Seleção Pós-Graduação		08/2012
Escola Anterior		Mês/Ano da Conclusão
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP		12/2010

Situação no Curso		Ano de Catálogo	Ano da Turma
AB - Saúde da Criança e do Adolescente		2012	2012
Curso em andamento			
Prazo para Integralização	Coefficiente de Rendimento (0 a 4)		
01/2015	4.0		
Aptidão em Língua Estrangeira	Data	Resultado	
Inglês	30/10/2012	Aprovado	
Exame de Qualificação	Data	Resultado	
Geral	19/05/2014	Aprovado	
Tema da Banca			
Avaliação da corrente pulsada e contínua pelo método de ionoforese por pilocarpina para estimulação e coleta de suor			
Comissão Examinadora - Exame de Qualificação			
Prof Doutor José Dirceu Ribeiro			
Orientador (es)			
Prof Doutor José Dirceu Ribeiro			



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Diretoria Acadêmica



Histórico Escolar

Nome	Registro Acadêmico
Carla Cristina Souza Gomez	106353

Aproveitamento de Estudos

1º Semestre de 2013					
Código	Nome da Disciplina	Conc.	CH	Crd	Situação
MP645	Metodologias de Pesquisas Aplicadas à Saúde da Criança e do Adolescente	A	45	3	Aprovado por Nota e Frequência

Carga Horária		
Total da Carga Horária Completada	Total da Carga Horária Supervisionada	Total de Créditos
210	210	14

Apêndice 2: Certificado PED



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Diretoria Acadêmica



Certificado

Nome		Registro Acadêmico	
Carla Cristina Souza Gomez		106353	
Documento de Identidade	CPF	Nascimento	Sexo
40348000-0 - SP	353.967.538-89	08/10/1985	Feminino
Naturalidade		Nacionalidade	
Franca		Brasileira	
Dados do Ingresso		Nível	
Curso: 44 - Mest. Saúde da Criança e do Adolescente		Mestrado	
Área de Concentração			
AB - Saúde da Criança e do Adolescente			
Reconhecido pela Portaria MEC nº 1077 de 31/08/2012			
Forma de Ingresso		Período de Ingresso	
Exame Seleção Pós-Graduação		2S/2012	
Escola Anterior		Mês/Ano da Conclusão	
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP		12/2010	
Situação no Curso		Ano de Catálogo	Ano da Turma
Curso em andamento		2012	2012

Certificado

A Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Resolução GR nº 31 de 07-07-2010, certifica que a interessada participou do Programa de Estágio Docente - Pós-Graduação - PED, no Grupo C - Atividades de Apoio a Docência Parcial, no segundo período letivo de 2013, com carga horária de 08 horas semanais, sob supervisão da Profa Doutora Mariana Pôrto Zambon, da Faculdade de Ciências Médicas, desta Universidade, na(s) disciplina(s) e turma(s) especificada(s) abaixo.

Disciplinas

Código	Turma	Nome
MD941	D	Atenção Integral à Saúde da Criança e do Adolescente I

Apêndice 3: Submissão em Periódico

Article title: Evaluation of pulsed direct currents and direct constant by iontophoresis of pilocarpine in individuals with and without cystic fibrosis

MS ID : 3404393751331076

Authors : Carla CS Gomez, Maria F Servidoni, Fernando AL Marson, Paulo JC Canavezi, Adriana M Vinagre, Eduardo T Costa, Maria AGO Ribeiro, Antonio F Ribero, Francisco U Vieira Jr and Jose D Ribeiro

Journal : BMC Medicine

Dear Miss Gomez

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

Apêndice 4: Publicações de abstracts/resumos em anais de congressos



Journal of Cystic Fibrosis

The Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society

Volume 12 (2013) Supplement 1

Abstracts of the
36th European Cystic Fibrosis Conference
Lisbon, Portugal, 12–15 June 2013

36 Clinical outcomes of cystic fibrosis patients during their first year of life after neonatal screening implementation

C.C.S. Gomez¹, M.F. Servidoni¹, J.F. Souza¹, M.A.G.O. Ribeiro¹, A.A.D.C. Toro², A.M. Vinagre¹, M. Goto¹, R.J.N. Nogueira¹, C.E. Levy³, G. Hessel⁴, J.D. Ribeiro¹, A.F. Ribeiro¹. ¹*State University of Campinas – Medical School, Pediatrics, Campinas, Brazil;* ²*State University of Campinas, Pediatrics, Campinas, Brazil;* ³*State University of Campinas – Medical School, Microbiology, Campinas, Brazil;* ⁴*State University of Campinas – Medical School, Campinas, Brazil*

Objectives: To assess the diagnostic and clinical outcomes of infants in their first year of life, followed up after cystic fibrosis newborn screening (NS).

Methods: A transversal and descriptive study including 24 infants followed up from 2010–2012 that were screened by immunoreactive trypsinogen (IRT) tests in 2 measurements in the first month of age with the cut-off value ≥ 70 ng/ml and positive sweat chloride test (SCT). The clinical outcomes were assessed in the months 0, 3, 6, 9, 12. All received similar treatment. Among 24 infants: 16 were male and 21 Caucasian. 3 died. IRT was realized during the first week and in the 3rd or 4th week of life. The mean values were: IRT1 = 191 ng/ml and IRT2=207 ng/ml. The mean values of SCT were 100.3 and 110 mEq/l. 90% presented respiratory manifestations and 33.33% had pulmonary colonization by *P. aeruginosa*. All 24 patients had digestive manifestations with 21% of steatorrhea mean values. In the first month of life, 16.66% and 12.5% of them had already been hospitalized for respiratory disorders and meconium ileus respectively. The most critical clinical health condition happened between 3 and 6 months of life, in which 45.83% were hospitalized (20.83% and 25% with metabolic and respiratory disorders). In the evaluation of 0, 3 and 6 months of life all infants presented one or more of: diarrhea, malnutrition, weight percentile <3 , persistent cough, dehydration and pulmonary exacerbations. No patient had the characteristics mentioned above at the age of 9 and 12 months.

Conclusion: The NS contributed for a good nutritional status, improvement of metabolic and respiratory conditions and lack of hospitalizations after 6 months of age.



CONGRESSO BRASILEIRO DE
**PNEUMOLOGIA
PEDIÁTRICA**

30 de abril a 3 de maio . 2014
Hotel Summerville | Porto de Galinhas | PE

CERTIFICADO

Certificamos que

MARIA DE FATIMA SERVIDONI; CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ; MARIA ÂNGELA RIBEIRO; FRANCISCO UBALDO VIEIRA JR.; FERNANDO MARSON; ADYLEIA TORO; JOSE DIRCEU RIBEIRO; ANTONIO FERNANDO RIBEIRO; SONIA LORENA; NEIVA DAMACENO; JOAQUIM CARLOS RODRIGUEZ; GIESELA FERRARI; VERA STEPANIAN; JOÃO BATISTA SALOMÃO; SONIA CHIBA; MARIA INÊS FERNANDES; GRUPO DE ESTUDO DO TESTE DO SUOR-SP

Participaram do 14º CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA, realizado no período de 30 de abril a 3 de maio de 2014 em Porto de Galinhas - PE.

na qualidade de autores do Poster Comentado: ESTIMULAÇÃO, COLETA E DOSAGEM DE ELETROLITOS NO TESTE DO SUOR: CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES CENTROS



Porto de Galinhas, 03 de maio de 2014

Eduardo da Silva Vaz
EDUARDO DA SILVA VAZ
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria

Murilo de Brito
MURILO DE BRITTO
Presidente do 14º Congresso Brasileiro de Pneumologia Pediátrica



CONGRESSO BRASILEIRO DE
**PNEUMOLOGIA
PEDIÁTRICA**

30 de abril a 3 de maio, 2014
Hotel Sumaréville | Porto de Galinhas | PE

CERTIFICADO

Certificamos que

CARLA CRISTINA SOUZA GOMEZ; MARIA DE FÁTIMA SERVIDONI; PAULO JOSÉ COELHO CANAVEZI; MICHELE M. V. SANTOS RONDON; CÉLIA REGINA PAVAN; EDUARDO TAVARES COSTA; ANTONIO FERNANDO RIBEIRO; FRANCISCO UBALDO VIEIRA JUNIOR; JOSÉ DIRCEU; MARIA ANGELA RIBEIRO; ADYLEIA DALBO TORO;

GABRIEL HESSEL; CARLOS EMÍLIO LEVY; ROBERTO NEGRÃO NOGUEIRA; FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON; SONJA LORENA;
GRUPO DE ESTUDO DO TESTE DO SUOR



Participaram do 14º CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA, realizado no período de 30 de abril a 3 de maio de 2014 em Porto de Galinhas - PE.

na qualidade de autores do Poster: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS CORRENTES CÍCLICA E CONTÍNUA NA ESTIMULAÇÃO E VOLUME DE SUOR PARA O DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA.

Porto de Galinhas, 03 de maio de 2014

Eduardo da Silva Vaz
EDUARDO DA SILVA VAZ
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria

Murilo de Brito
MURILLO DE BRITO
Presidente do Núcleo Brasileiro de
Pneumologia Pediátrica

Hall B2-38 (12:50 - 14:40)
Thematic Poster Session
Panel 5

07.09.2014 – Session 118

P1217

Evaluation of the effectiveness of cyclical and constant current on sweat volume and stimulation
for cystic fibroses diagnoses

C. Gomez, M. Servidoni, F. Marson, P. Canavezi, A. Vinagre, C. Pavan, M. Santos-Rodon, E. Costa, A.
Ribeiro, M. Ribeiro, F. Vieira Junior, G. Hessel, C. Levy, C. Bertuzzo, S. Lorena, J. Ribeiro (Campinas,
Brazil)

Instructions to authors: Display your poster on the poster board. After the session, remove this paper sheet
from the plastic folder. Thank you in advance.

