UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ALICE BELLA LISBÔA REZENDE

Evaporimetria: Valores da estimulação β-adrenérgica da glândula sudorípara em adultos saudáveis

CAMPINAS

2019

ALICE BELLA LISBÔA REZENDE

Evaporimetria: Valores da estimulação β-adrenérgica da glândula sudorípara em adultos saudáveis

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

ORIENTADOR: Prof.ª Drª. Maria de Fátima Pimenta Servidoni

COORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALICE BELLA LISBÔA REZENDE, E ORIENTADO PELA PROFª. DRª. MARIA DE FÁTIMA PIMENTA SERVIDONI.

CAMPINAS

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

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

R339e

Rezende, Alice Bella Lisbôa, 1984-
Evaporimetria : valores da estimulação B adrenérgica da glândula sudorípara em adultos saudáveis / Alice Bella Lisbôa Rezende. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria de Fátima Corrêa Pimenta Servidoni.
Coorientador: Antonio Fernando Ribeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Evaporimetria. 2. Fibrose cística. 3. Diagnóstico. 4. Suor. I. Servidoni, Maria de Fátima Corrêa Pimenta, 1961-. II. Ribeiro, Antonio Fernando, 1948-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaporimetry : values of B adrenergically induced sweat secretion of the sweat gland in healthy adults
Palavras-chave em inglês:
Evaporimetry
Cystic fibrosis
Diagnosis
Sweat
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente
Titulação: Mestra em Ciências
Banca examinadora:
Maria de Fátima Corrêa Pimenta Servidoni [Orientador]
Mônica de Cássia Firmida
Adyléia Aparecida Dalbo Contrera Toro
Data de defesa: 30-01-2019
Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ALICE BELLA LISBOA REZENDE

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI

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

MEMBROS:

1. **PROF(A). DR(A). MARIA DE FÁTIMA CORRÊA PIMENTA SERVIDONI**

2. **PROF(A). DR(A). ADYLÉIA APARECIDA DALBO CONTRERA TORO**

3. **PROF(A). DR(A). MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA**

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

Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: 30 de janeiro de 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que são meus maiores exemplos de seres humanos e que me encorajaram a nunca desistir de buscar a realização dos meus sonhos.

Aos pacientes de FC que são a principal razão deste estudo e a todos que acreditam que de verdade buscamos o tratamento eficiente e a cura da FC. Obrigada por me inspirarem a prosseguir todos os dias!

AGRADECIMENTOS

A Deus - meu mestre amado, que sempre me amparou, por sempre estar me guiando e por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

A meus pais que me deram a vida e sempre estiveram ao meu lado apoiando minhas escolhas rumo a realização dos meus sonhos, enxugando minhas lagrimas e comemorando minhas conquistas.

A Prof.ª. Dra. Maria de Fátima Pimenta Servidoni, minha orientadora e verdadeiro anjo da guarda, que me acolheu na Unicamp, acreditou neste projeto e em mim e me permitiu crescer, amadurecer e vencer. Foi um privilégio trabalhar com você e aprender com seu amor pelos pacientes e pela FC. Obrigada por não desistir de mim, graças a você, chegamos até aqui!

Aos inúmeros colaboradores que contribuíram cada um de uma forma impar para o sucesso desta dissertação: meu coorientador, Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro, Prof. Dr. Jose Dirceu Ribeiro e Prof. Dra. Maria Ângela Ribeiro. Obrigada por toda a orientação e carinho.

Prof.ª. Dra. Adyleia Toro e Dra. Carmem Bertuzzo, muito obrigada pela disposição, conselhos e contribuições generosas. Prof. André Morcillo, obrigada pela participação. Prof.ª. Dra. Marisa Isabel Lopes de Sousa, obrigada por suas contribuições e parceria direto de Portugal. Gabriel Kraszczuk, obrigada pelo desenvolvimento do programa, facilitou muito nosso trabalho.

Aos meus queridos amigos: Silvana Dalge Zeferino, Carla Gomez e Fernando Marson, que seria de mim sem vocês. Quantas manhãs e tardes juntas. Que orgulho contar com a colaboração e expertise de cada um. Poder contar com vocês ao longo destes anos fez toda a diferença!

Aos funcionários e amigos do CIPED e da Pós-Graduação. Muito obrigada por me ajudarem e orientar nas muitas vezes em que me encontrava perdida. Existem pessoas que mesmo sem saber nos ajudam e muito com um simples bom dia animado pela manhã.

Aos meus amigos e colegas de trabalho da Unimetrocamp que seguraram a barra nos momentos em que precisei me ausentar, me estimularam e torceram por mim. Cegou a hora de colhermos os frutos!!!

A todos os participantes deste estudo que de maneira voluntária dedicaram um tempinho de suas vidas para a pesquisa em prol de um bem maior, meu muito obrigada!

A minha família e amigos em geral, em especial ao Guilherme, porque sei que torcem de verdade por mim e compartilham da minha alegria. Obrigada pelas orações e amor. Vamos brindar a mais essa conquista.

Cheguei até aqui por e com todos vocês. Se esqueci de alguém, peço desculpas e tenha certeza que se participou ou contribuiu de alguma forma, por menor que seja, estará sempre presente no meu coração e minha gratidão a vocês será eterna. Sem vocês nada disso teria sido possível. Muito obrigada!!!

RESUMO

Introdução: A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva, com expressividade variável, progressiva, cujo defeito ocorre no gene que codifica a proteína de mesmo nome *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) que funciona como canal de cloro. As manifestações clínicas variam segundo o tipo de mutação genética e ambiente. O diagnóstico da FC baseia-se em achados clínicos multissistêmicos, antecedentes familiares, níveis elevados de cloro no teste do suor (TS) e rastreamento neonatal. A confirmação da FC é feita por testes de suor alterados e/ou identificação de duas mutações no gene *CFTR.* Os estudos bioelétricos (biopsia retal, estimulação β-adrenérgica da glândula sudorípara e diferença de potencial nasal) são uma nova opção, uma vez que podem expressar a função do canal CFTR que, somados ao TS e quadro clínico, contribuem para o diagnóstico in vivo. Todavia, os estudos de estimulação β-adrenérgica da glândula sudorípara (Evaporimetria) existentes foram realizados apenas na população americana e canadense. **Objetivo Geral:** Estabelecer valores de secreção de suor por estimulação β-adrenérgica em pessoas saudáveis na cidade de Campinas/SP. **Método:** Estudo experimental, de corte transversal, em 60 sujeitos hígidos, entre 18 e 70 anos, com mediana de idade de 26 anos, 57 indivíduos foram incluídos no estudo, e foram submetidos a dois testes de evaporimetria e dois TS, nos braços direito (BD) e esquerdo (BE); coleta de sangue para sequenciamento genético, e espirometria, no período de abril de 2016 a novembro de 2017. **Resultado:** Houve correlação positiva e significante dos testes entre braços, porém a concordância não ocorreu para a razão β-adrenérgico/Colinérgico e a dosagem de cloro. Os valores da secreção de suor por estimulação β-adrenérgica não variaram em relação ao membro dominante, prática de atividade física e período de ciclo menstrual. Houve influência da umidade no estímulo β-adrenérgico e da temperatura no teste do suor. Variáveis antropométricas e o sexo influenciaram na resposta ao estímulo β-adrenérgico, sendo maior nos homens que nas mulheres. Houve correlação fraca/moderada entre marcadores da espirometria com o resultado do estímulo β-adrenérgico e a dosagem de cloro. O teste foi tolerado, e a dor foi referida como leve em mais da metade dos testes. **Conclusão:** A secreção de suor por estímulo β-adrenérgico da glândula sudorípara apresentou comportamento diferente dos estudos anteriores. Acreditamos que nossos achados devam ser tidos como base para referência para nossa população, no caso da avaliação de saudáveis com ausência de variantes patogênicas do *CFTR*. Por ser reprodutível, o estímulo β-adrenérgico poderá ser implementado como nova ferramenta de diagnóstico da FC e seu uso para avaliar a função da CFTR deve ser estimulado em ensaios clínicos.

Palavras chave: Fibrose cística; Evaporimetria; Diagnóstico; Secreção de suor por estimulação β-adrenérgica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive hereditary disease with variable, progressive expressivity whose defect occurs in the gene that codes the protein with the same name cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) that functions as a chlorine channel. Clinical manifestations vary according to the type of genetic mutation and environment that the individual lives. The diagnosis of CF is based on multisystemic clinical findings, family history, high levels of chlorine in the sweat test (TS) and neonatal screening. Confirmation of CF is made by altered sweat tests and / or identification of two mutations in the CFTR gene. Bioelectrical studies (rectal biopsy, β-adrenergic stimulation of the sweat gland and nasal potential difference) are a new option, since they can express the function of the CFTR channel, that along with TS and clinic, contribute to in vivo diagnosis . However, studies of β-adrenergic stimulation of the sweat gland (Evaporimetry) were performed only in the American and Canadian populations. General objective: To establish sweat secretion values by β-adrenergic stimulation in healthy people in the city of Campinas / SP. **METHODS:** Experimental cross-sectional study of 60 healthy subjects aged 18 to 70 years, median age of 26 years, 57 subjects were included in the study, and were submitted to two tests of evaporimetry and two TS, in the right arm (BD) and left (BE); blood was collected for genetic sequencing, and they did spirometry test. Tests were done from April 2016 to November 2017. **RESULTS:** There was a positive and significant correlation between arms tests, but concordance did not occur for the β-adrenergic / cholinergic ratio and the dosage of chlorine. The values of sweat secretion by β-adrenergic stimulation did not change in relation to the dominant limb, physical activity practice and menstrual cycle period. There was influence of moisture on the β-adrenergic stimulus and temperature on the sweat test. Anthropometric variables and sex influenced the response to the β-adrenergic stimulus, being higher in men than in women. There was a weak / moderate correlation between spirometry markers with the β-adrenergic stimulus result and the chlorine dosage. The test was tolerated, and pain was reported as mild in more than half of the tests. **CONCLUSION:** Sweat secretion by β-adrenergic stimulus of the sweat gland presented different behavior from previous studies. We believe that our findings should be taken as reference for our population, in the case of healthy evaluation with absence of pathogenic variants of CFTR. Because it is reproducible, the β-adrenergic stimulus could be implemented as a new CF diagnostic tool and its use to evaluate the function of CFTR should be stimulated in clinical trials.

Keywords: Cystic fibrosis; Evaporimetry; Diagnosis; Sweat secretion by β-adrenergic stimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Prevalência de nascidos vivos com Fibrose Cística e as mutações comuns. 18

Figura 2 Distribuição dos 3554 pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística quanto a região de nascimento..... 19

Figura 3 Gene da fibrose cística localizado no braço longo do cromossomo 7. 20

Figura 4 Classificação das mutações do CFTR e respectivas estratégias terapêuticas 22

Figura 5 Recomendações do Consenso da Cystic Fibrosis Foundation de 2017 para o diagnóstico de Fibrose Cística 25

Figura 6 Curvas de resposta da diferença de potencial nasal. A) traçado de indivíduo normal B) traçado de indivíduo com FC 29

Figura 7 A glândula exócrina de suor..... 30

Figura 8 Desenho do estudo 35

Figura 9 Demonstração da colocação e posicionamento dos sensores (A e B) no antebraço do paciente. 37

Figura 10 Aparelho Evaporímetro CyberDerm RG-1 (Dasylab, Broomall, PA, EUA) ... 38

Figura 11 Injeção intradérmica de 0,2 mL de atropina 39

Figura 12-A - Demonstração da realização do exame e gráfico gerado pelo software Figura 12-B gerada no laudo do paciente 40

Figura 13-A Estímulo da sudorese por iontoforese, 13B - coleta do suor..... 41

Figura 14 Realização de Espirometria 42

Figura 15 Associação entre braços (direito versus esquerdo) para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a concentração de cloreto obtida no teste do suor. 52

Figura 16 Correlação de Spearman (Rho) entre os dados obtidos em ambos os braços (direito versus esquerdo), para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a concentração de cloreto obtida no teste do suor. 53

Figura 17. Bland-Altman plot entre os dados obtidos em ambos os braços (direito versus esquerdo), para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a concentração de cloreto obtida no teste do suor. 54

Figura 18. Correlação de Spearman entre os valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão β-adrenérgico/colinérgico e concentração do íon do cloreto no teste do suor 55

Figura 19. Correlação de Spearman dos valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão β-adrenérgico/colinérgico e concentração do íon do cloreto no teste do suor com a umidade do ambiente e temperatura do ambiente durante a realização dos testes. 57

Figura 20. Correlação de Spearman dos valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão β-adrenérgico/colinérgico e concentração do íon do cloreto no teste do suor com a idade, altura, peso e índice de massa corpórea dos participantes. 60

Figura 21. Correlação de Spearman entre os valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão β-adrenérgico/colinérgico e os marcadores da prova de função pulmonar dos participantes do estudo. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de referência de evaporimetria da população norte americana. 32

Tabela 2. Sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tampão e tamanho dos fragmentos. 44

Tabela 3. Resultados dos testes de suor por grupo normal *, limítrofes** e anomais***, ... 49

Tabela 4 Descrição dos dados (categóricos e numéricos) clínicos, demográficos e laboratoriais 50

Tabela 5. Associação do sexo dos participantes com os valores do estímulo β-adrenérgico de acordo com o braço avaliado 54

Tabela 6 Estímulo β-adrenérgico e razão entre o pico do estímulo β-adrenérgico e pico de estímulo colinérgico considerando os pontos de corte de normalidade descritos na literatura para indivíduos controles sem mutações do *CFTR* ou com apenas uma variante patogênica no gene *CFTR* (heterozigoto).. 56

Tabela 7. Comparação descritiva entre os valores de referência para o estímulo β-adrenérgico da glândula sudorípara..... 56

Tabela 8. Associação do status do IMC e da menstruação dos participantes. 60

Tabela 9. Escala visual analógica para dor e qualidade da bolha após cada injeção no de acordo com o braço. 62

Tabela 10. Dados dos pacientes que foram excluídos por apresentarem TS alterado e evaporimetria. Foram detectadas em dois pacientes mutações na CFTR..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

ATP - Adenosina trifosfato

BD – Braço Direito

BE – Braço Esquerdo

CBAVD – Congenital bilateral absence of the vas deferens

Cl^- – Íon cloreto

$[Cl^-]$ – Concentração do íon cloreto

CCH – Carbacol

CFSPID – Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

CFTR-RD – *CFTR-Related Disease*

CIPED - Centro de Investigação em Pediatria

CRMS – *CFTR-Related Metabolic Syndrome*

CVF% - Capacidade Vital Forçada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPN – Diferença de Potencial Nasal

EVA – Escala Visual Analógica de Dor

FC – Fibrose Cística

IFSP – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo

IMC – Índice de Massa Corporal

IP – Insuficiência Pancreática

IRT- Tripsina Imuno Reativa

Na^+ - Íon Sódio

$[Na^+]$ – Concentração íon Sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAm - Ácido Ribonucleico mensageiro

SSCP – Polimorfismo de conformação de cadeia simples

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TS – Teste do Suor

TTN – Teste de Triagem Neonatal

VEF (25-75) - Fluxo Expiratório Forçado 25-75%

VEF1% - Volume Expiratório Forçado no Primeiro segundo

VF1/CVF – Relação Volume Expiratório Forçado no Primeiro segundo e Capacidade Vital Forçada

SUMÁRIO

1. Introdução 17
1.1 Teste do suor 26
1.2 Testes Genéticos 26
1.3 Triagem Neonatal 27
1.4 Estudos Bioelétricos 27
1.4.1 A Biopsia Retal 28
1.4.2 Diferença de Potencial Nasal 28
1.4.3 Teste do evaporímetro: estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara. 29
2. Objetivo 33
I. Objetivo Geral 33
II. Objetivos Específicos 33
3. Métodos 34
3.1 Desenho 34
3.2 Seleção dos Sujeitos 35
3.3 Critério de Inclusão 36
3.5 Coleta de dados e marcadores avaliados 36
3.6 Procedimentos 37
3.6.1 Teste do Evaporímetro: Estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara 37
3.6.2 Teste do suor clássico 40
3.6.3 Espirometria 41
3.6.4 Estudo Genético 42
3.7 Avaliação Qualitativa 45
3.8 Análise dos Dados 45
4. Resultados 46
4.1. Análise descritiva dos marcadores e dados obtidos na avaliação da função da CFTR 47
4.2. Comparação entre os braços avaliados para os exames e entre a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e teste do suor 50
4.3. Correlação entre a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor 54

4.4. Correlação da temperatura e umidade do laboratório com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor 56
4.5. Associação dos marcadores clínicos, demográficos e laboratoriais com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor..... 59
4.6. Associação da espirometria (litros) com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor..... 61
4.7. Descrição da dor e qualidade da bolha 61
4.8. Descrição da Duração do Teste 62
4.9 Resultados dos Participantes Excluídos..... 63
5. Discussão..... 64
5.1. Limitações 68
6. Conclusão 69
7. REFERÊNCIAS..... 70
8. ANEXOS 75

1. Introdução

A fibrose cística (FC) é uma doença hereditária, autossômica recessiva, multifatorial, progressiva com predomínio na população caucasiana. Os relatos acerca da origem dessa doença datam da idade média, quando se atribuía um caráter de feitiçaria e mau agouro às crianças que quando beijadas apresentavam um gosto mais salgado no suor, uma vez que essas crianças vinham a óbito precocemente (Quinton & Bijman, 1983). Na mesma época houve relatos de um tipo de indigestão crônica que afetava crianças de 1 a 5 anos; Landsteiner, em 1905, publicou estudo associando íleo meconial à enfermidade pancreática. No início do século 20 começou a se associar a função pancreática anormal com diarreias e doença pulmonar, e a se observar uma prevalência de casos congênitos em uma mesma família. Em 1946, Anderson e Hodges descobriram a herança autossômica recessiva que caracterizavam a FC como uma doença genética (Anderson & Hodges, 1946).

O defeito no gene *CFTR*, que codifica uma proteína também denominada CFTR, foi descoberto em 1985 após esforços conjuntos de três laboratórios. Posteriormente, foi comprovado que essa proteína funciona como um canal de cloro (Bear et al., 1992) e também de bicarbonato, com interação na secreção de outros íons como sódio (Na^+) (Quinton PM., 2017). Essa proteína é expressa nas células epiteliais de vários órgãos: no trato respiratório, digestório, nas glândulas salivares e sudoríparas e no aparelho reprodutor masculino. Na FC a função dessa proteína está diminuída ou abolida. A intensidade das manifestações clínicas varia de acordo com o tipo de mutação genética e o ambiente onde estes indivíduos vivem.

A doença é rara, e tem predomínio na população caucasiana do mundo, com uma reconhecida heterogenicidade na distribuição geográfica. Ela é mais prevalente na Europa, América do Norte e Australásia. É incomum na população árabe, no leste asiático e na África, com exceção da população descendente de europeus que habitam essas regiões (Mehta G, et al 2010). A incidência estimada é de 2500–4000 em nascidos-vivos (Amaral, MD 2015) afetando assim mais de 85.000 sujeitos em todo o mundo. Observa- se na Figura 1 a prevalência e as mutações mais comuns de nascidos vivos com FC.

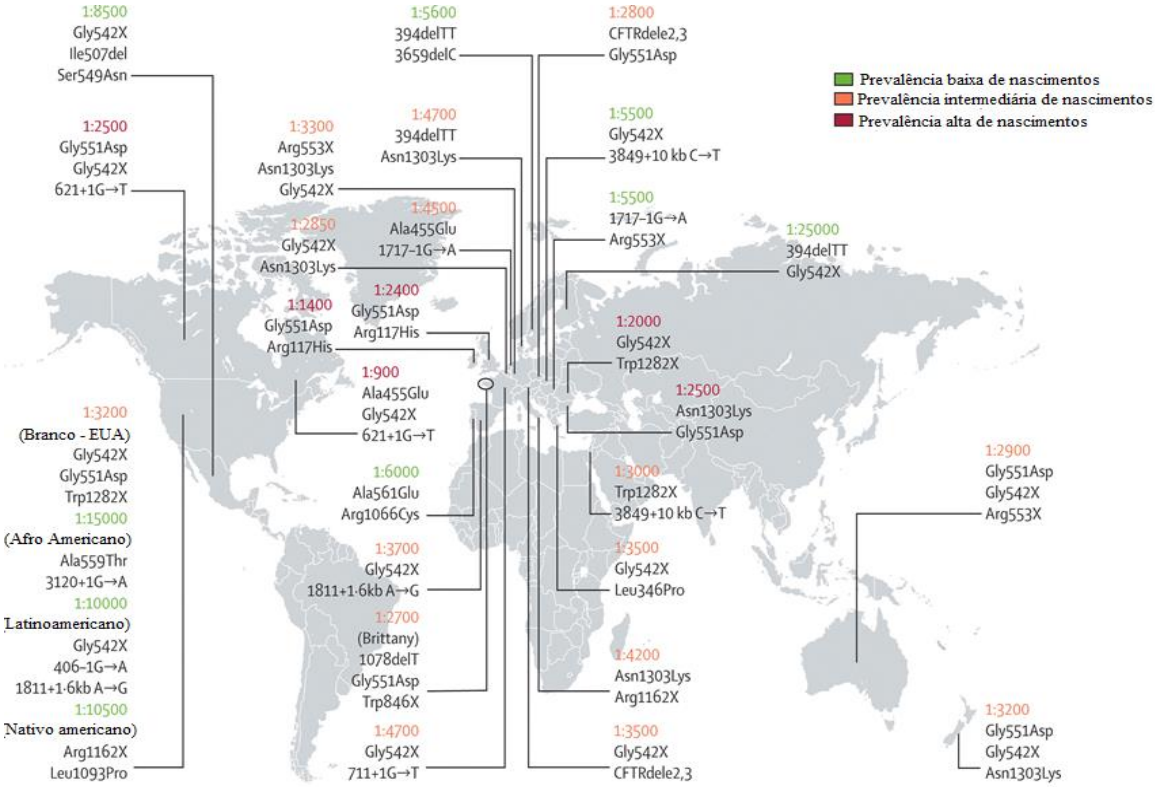


Figura 1. Prevalência de nascidos vivos com Fibrose Cística e as mutações comuns com exceção da F508Del. Adaptado de O'Sullivan BP, Freedman SD, 2009.

No Brasil, devido à grande miscigenação racial, a incidência varia de acordo com a região estudada (Figura 2) e a FC pode se manifestar em qualquer população, sendo a incidência estimada de 1:10.000 nascidos vivos e chegando próxima à incidência da população europeia na região sul (Ribeiro JD, et al 2002).

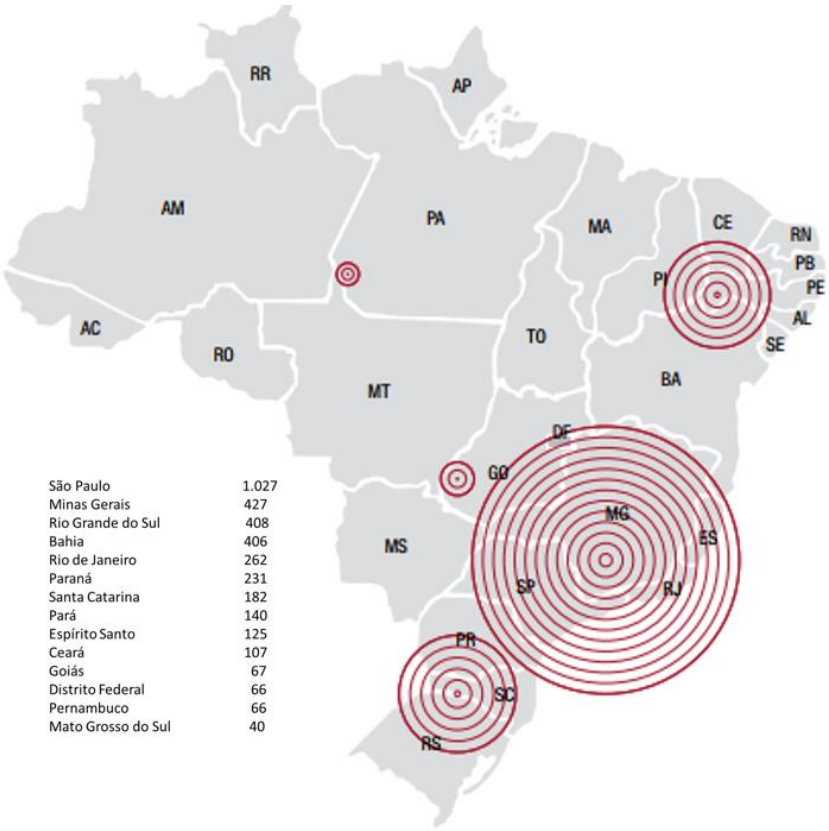


Figura 2. Distribuição dos 3554 pacientes com diagnóstico de Fibrose Cística quanto a região de nascimento. Registro Brasileiro de Fibrose Cística, 2014. http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2016/11/Registro2014_v09.pdf. Acessado em 20/9/2018.

Atualmente são descritas aproximadamente 2.000 mutações do gene *CFTR* (Farrell PM. et al 2017). Podem-se dividir as mutações em classes, de acordo com a produção, tráfego, função e estabilidade da proteína CFTR. A divisão em classes é didática e auxilia a elaborar estratégias terapêuticas para o tratamento do paciente com FC (De Boeck K, 2011). A F508del é a mutação mais prevalente em todo o mundo (Figura 3), incluindo o Brasil (Bonadia et al., 2014). As mutações são responsáveis pelo fenótipo da FC.

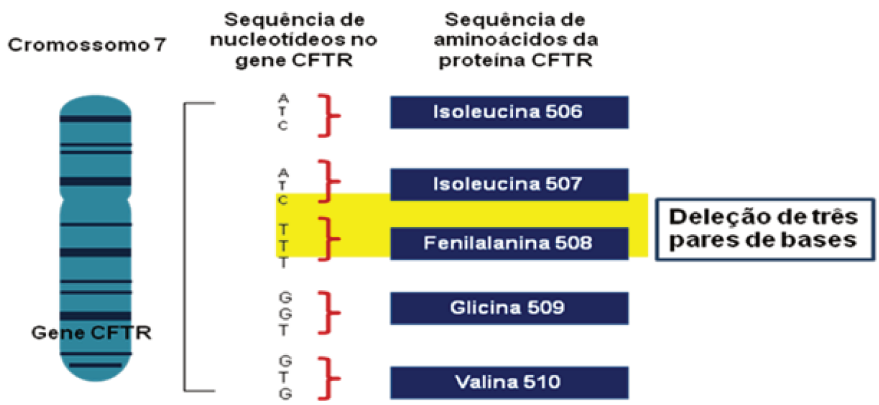


Figura 3. Gene da fibrose cística localizado no braço longo do cromossomo 7. A mutação F508del, ocorre quando há uma deleção de três pares de base, acarretando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (Fonte: Gonçalves et al., 2013 [Dissertação]).

De acordo com o banco de dados do CFTR2/CFTR2, dentre as 2000 mutações descritas até o momento, 374 foram associadas à disfunção da CFTR e estão distribuídas como a seguir: (I) 312 sabidamente causam FC; (II) 36 causam consequências clínicas variáveis; (III) 13 não causam FC clássica e (IV) 13 têm significado desconhecido (https://www.cftr2.org).

As mutações são classificadas de acordo com o efeito na expressão da proteína CFTR e predispõem a maior ou menor gravidade clínica (Kuhnl & Faucz, 2005). Atualmente, já é aceita a divisão em 7 classes (Figura 4) (De Boeck K, 2017).

As mutações de classe I são as mais graves, causam defeitos na síntese da proteína, gerando proteínas incompletas (truncadas). Existe produção de um RNA defeituoso, que acabará por ser degradado. Isso pode ocorrer por alterações nos sinais de *splicing*, por mudanças nas matrizes, ou pela formação de códons de parada prematura, que levam à degradação do RNAm (Gonska T, et al , 2018). Na classe I (anterior IA) existe produção de um RNAm que acabará por ser degradado, enquanto que na classe VII (anterior IB), não existe sequer produção de RNA (Gonska T, et al, 2018).

Nas mutações de Classe II, que incluem as de maior frequência para a doença, a F508del (Knowles M, et al 1981), a proteína é transcrita, mas não sofre processo de maturação e migração até a membrana plasmática, ela fica retida

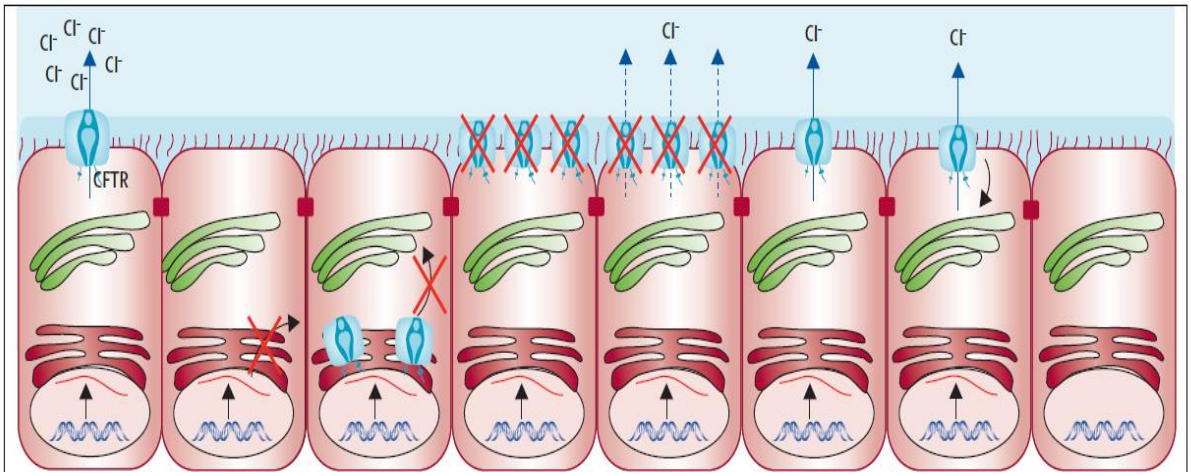
no retículo endoplasmático por um mecanismo de “controle de qualidade” e é posteriormente degradada prematuramente no complexo de Golgi, afetando o tráfego da proteína e impedindo a sua migração até a membrana celular. Nesta classe há um comprometimento severo da função da proteína CFTR.

As mutações de classe III estão associadas à regulação alterada no canal de cloro, caracterizada pelo bloqueio do transporte iônico, devido à incapacidade de abertura desse canal. A proteína é produzida e transportada até a membrana celular, porém não responde à estimulação do cAMP, por defeitos na fosforilação por cinases no domínio regulador (Keenan K, 2014). Como consequência há uma alteração da regulação do canal e diminuição de sua atividade.

Nas mutações de classe IV o gene codifica uma proteína que é transportada para a membrana celular e responde corretamente aos estímulos pela adenosina trifosfato (ATP), porém o fluxo de cloreto e bicarbonato é reduzido (Gonska T, 2018).

As mutações de classe V estão associadas a menor síntese de CFTR; ela produz proteínas normais, porém em quantidades reduzidas que alocadas na membrana possuem pequenos níveis funcionais, produzindo uma secreção residual da concentração do íon cloreto ($[Cl^-]$) (Keenan K, 2014). Níveis de expressão de pelo menos 5% de RNAm normal estão associados ao melhor prognóstico da doença (Gonska T,2009)

As mutações de classe VI levam à produção de proteínas que possuem tempo de permanência reduzido na membrana apical das células em virtude da baixa estabilidade (Quinton P, 2012). Isso pode ocorrer pelo aumento da endocitose da proteína ou diminuição do seu processo de reciclagem de volta à superfície celular (Derichs N, et al 2010).



	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Classe VI	Classe VII
Defeito CFTR	Ausência de proteína	Ausência de tráfego	Abertura prejudicada	Fluxo reduzido	Pouca proteína	Proteína instável	Ausência de RNA m
Exemplos de mutações	GLy542X Trp1282X	Phe508del Asn1303Lys Ala561Glu	Gly551Asp Ser549Arg Gly1349Asp	Arg117His Arg334Trp Ala455Glu	Ala455Glu 3272-26A->G 3849+10kgC->T	c120del23 rphe508del	dele2,3(21kb) 1717-1G->A
Terapia Corretiva	Resgatar síntese	Resgatar tráfego	Restaurar canal	Restaurar canal	Corrigir *splicing*	Promover estabilidade	Não resgatável
Droga (aprovada)	Compostos RTC (não)	Corretores (sim)	Potencializadores (sim)	Potencializadores (não)	Oligonucleotídeos "anti-sentido", corretores, potencializadores ? (não)	Estabilizadores (não)	Terapias de *by-pass* (não)

Figura 4. Classificação das mutações do CFTR e respectivas estratégias terapêuticas (reproduzido De Boeck e Amaral (Derichs N, et al 2010)).

Recentemente tem se discutido muito acerca das informações referentes ao fenótipo e genótipo envolvendo a FC. Os consensos têm sido atualizados e buscam harmonizar a terminologia envolvida na FC juntamente com os critérios diagnósticos (De Boek *et al,*2017).

A classificação mais recente, divide os fenótipos em:

a) FC;

b) Síndrome metabólica relacionada a CFTR (CRMS, do inglês CFTR-Related Metabolic Syndrome) ou diagnóstico inconclusivo pós triagem neonatal (CFSPID, do inglês Cystic Fibrosis Screen Positive Inconclusive Diagnosis);

c) Doenças relacionadas à CFTR (CFTR-RD-do inglês, CFTR-Related Disorders).

Os termos FC clássica / não clássica, FC típica / atípica e FC tardia devem ser evitados pois não há uma definição de consenso, embora ainda sejam utilizados em alguns estudos e na sociedade europeia (Farrell PM, 2017).

A FC pode caracterizar-se por sintomas graves, em que há presença do suor salgado, insuficiência pancreática (IP) exócrina acompanhada de esteatorreia e desnutrição, obstrução de íleo terminal por mecônio espesso, doença hepática crônica e cirrose biliar associada a hipertensão porta (Ribeiro et al., 2002, Levy e Farell**,** 2015). O comprometimento pulmonar é progressivo e a doença pulmonar obstrutiva é de intensidade variável. Todavia é determinante para o prognóstico do paciente e a principal causa de óbito. As alterações do sistema reprodutor consistem em azoospermia em 95% dos homens com FC (Moskowitz et al., 2008).

A FC pode se apresentar dessa forma mais característica, que acarreta maior gravidade, porém podem também ocorrer manifestações mais tardias (cerca de 10% a 15% dos doentes FC), associadas à suficiência pancreática, refletindo alguma taxa de função da CFTR, pancreatites recorrentes, sintomas respiratórios ou otorrinolaringológicos crônicos mais brandos e/ou tardios e azoospermia, que corresponde a uma doença mais suave e com melhor prognóstico. Nesses casos, o exame do suor pode ser normal, limítrofe (*borderline*) ou com valores anormais, porém com valores mais baixos dos que com fenótipo mais severo, trazendo por vezes dificuldades no diagnóstico (Quinton et al., 2012; Levy e Farell, 2015; De Boek et al, 2017).

Os pacientes com Síndrome metabólica relacionada à CFTR (CFTR-Related Metabolic Syndrome - CRMS) ou diagnóstico inconclusivo pós triagem neonatal (CFSPID) definem a mesma condição: possuem resultado positivo para o Teste de Triagem Neonatal (TTN) e testes genéticos ou funcionais inconclusivos. Ambos devem ser usados apenas para sujeitos com TTN positivo sem características que preencham critérios diagnósticos para FC, ou seja: criança com TTN positivo e TS < 30 mmol/L e 2 mutações, em que pelo menos uma delas se relaciona às características fenotípicas não definidas, ou valor intermediário do TS (30 a 59 mmol/L) e uma ou nenhuma mutação causadora de FC (Levy e Farell, 2015). Os pacientes classificados neste grupo deverão repetir o TS num centro especializado em FC, manter seguimento por

especialista a fim de detectar características clínicas que poderão aparecer ao longo do tempo, ter a indicação para sequenciamento genético próprio (gene *CFTR*) e de familiares, assim como a realização de testes bioelétricos.

Existem algumas situações clínicas, associadas à disfunção da proteína CFTR, que são chamadas de doenças relacionadas à CFTR (CFTR-RD) pois não preenchem os critérios diagnósticos para a FC (Bombieri C, 2011). Podemos citar dentro deste grupo de doenças: ausência bilateral congênita dos ductos deferentes (CBAVD), bronquiectasias difusas, pancreatite crônica ou aguda recorrente, rinossinusite e Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) (Dequeker E, 2009). São doenças ainda pouco estudadas quanto ao envolvimento da proteína CFTR e de outros transportadores transmembrana e cuja fisiopatologia merece uma atenção por parte dos clínicos e pesquisadores quanto ao diagnóstico, prognóstico e tratamento (Levy e Farrell, 2017).

A classificação das doenças que expressam o defeito no gene CFTR é complexa, não só por causa das várias mutações até hoje descritas, mas também porque a sua expressão fenotípica pode ser modulada por polimorfismos e variações não classificadas (De Boeck K, 2013). Os polimorfismos em outros genes, somados ao meio ambiente, atuam modificando a expressão clínica da FC (De Boeck K, et al 2006). São vários os genes que atuam modulando a gravidade clínica da FC, acarretando um amplo espectro fenotípico (Boyle MP, 2003; Noone PG, 2001) e fazendo com que a relação entre a mutação genética e o fenótipo não seja tão exata (Ooi C, et al 2014).

Nos últimos anos, os avanços no diagnóstico e na terapêutica, propiciaram um aumento na expectativa e melhora na qualidade de vida dos pacientes portadores de FC (De Boek et al, 2017). O diagnóstico clássico da FC (85% dos casos) é confirmado pelo TS em duas dosagens ($[Cl^-] \geq 60mEq/L$) e ou pela detecção de duas mutações para FC, associados a achados clínicos com dois acometimentos multissistêmicos (manifestações pulmonares e/ou gastrointestinais, desnutrição e infertilidade no homem) (Farrell, 2008).

A fim de padronizar definições e terminologias utilizadas para a FC e transtornos relacionados a CFTR, a Cystic Fibrosis Foundation convocou 32 especialistas em diagnóstico de FC de nove países diferentes com o objetivo de

elaborar diretrizes diagnósticas e estabelecer recomendações (Figura 5) com a aprovação de ao menos 80% de votos favoráveis entre os participantes (Farrell PM, 2017; Sosnay PR,2017). As Figuras 5 e 6 trazem um resumo do consenso para a formação de diagnóstico para a FC (Farrell PM, 2017).

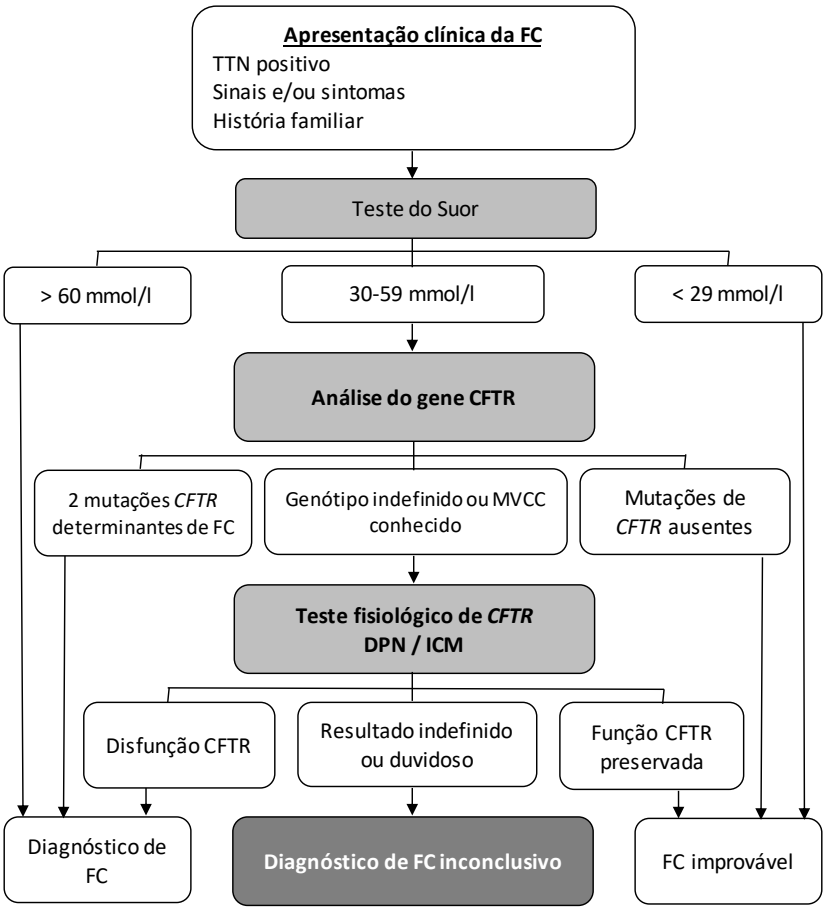


Figura 5. Recomendações do Consenso da Cystic Fibrosis Foundation de 2017 para o diagnóstico de Fibrose Cística – adaptado (Farrell PM, 2017). MVCC: mutações com consequências clínicas variadas; ICM: medida da corrente intestinal (biópsia retal).

Recentemente se tornou possível realizar a medição da atividade das glândulas sudoríparas em resposta a estimulação β-adrenérgica do suor através de um teste conhecido como teste do evaporímetro. O evaporímetro é um aparelho que detecta pequenas quantidades de suor na pele e que foi inicialmente concebido para a realização de testes dermatológicos porque é sensível e detecta mínimas concentrações de suor. **Este teste é o foco principal deste trabalho, que visa estabelecer os valores de normalidade da secreção de suor por estimulação β-adrenérgica, em indivíduos**

saudáveis, sem mutação no gene *CFTR,* de uma amostra da população da cidade de Campinas/SP.

1.1 Teste do suor

O TS pela técnica quantitativa da iontoforese de pilocarpina, desenvolvida em 1959 por Gibson e Cooke (Gibson e Cooke, 1959), é reconhecido até hoje como método padrão ouro para o diagnóstico da FC; e, foi o único método existente da década de 50 até início dos anos 80. Está sendo questionado como tal principalmente nas formas mais brandas da doença (15%), em que seus valores podem ser normais ou limítrofes. A confirmação da FC deve ser realizada por dois ou mais TS alterados e/ou estudo genético (determinação dos dois alelos mutantes). O aparelho usado para induzir o suor utiliza a iontoforese, técnica não invasiva que usa corrente elétrica (0,1 a 1 mA/cm2) para aumentar a transferência transdermal de uma variedade de drogas (Beauchamp e Lands, 2005); no caso do TS utiliza-se a iontoforese de pilocarpina através da aplicação de uma corrente contínua e eletrodos fixados no antebraço do paciente. O teste deve ser realizado por profissional experiente e devidamente treinado, para diminuir o risco de reações adversas como queimadura, ardência, choque elétrico, que é maior se o profissional cometer o erro de deixar o metal do eletrodo entrar em contato direto com a pele. Reações como formigamento, eritema e prurido podem ocorrer e são toleráveis. Preferencialmente deve ser realizado em laboratório relacionado a um centro de referência e que siga padrões de qualidade interno e externo (Servidoni MF, 2017).

Em pacientes com FC há concentração aumentada de $[Cl^-]$ e $[Na^+]$ no suor. Os valores de $[Cl^-] \geq 60$ mmol/L são considerados anormais (Farrell e Koscik, 1996), e os valores entre 30 mmol/L e 59 mmol/L são limítrofes (Taylor, Hardcastle e Southern, 2009). O TS pode ter resultados falso positivos e o valor de (Na^+) é usado para qualidade do teste. A diferença entre a dosagem de $[Na^+]$ e $[Cl^-]$ não deve ultrapassar 20mEq/L, sendo a relação $[Cl^-] / [Na^+] > 1$.

1.2 Testes Genéticos

O diagnóstico genético se baseia na identificação de duas mutações no gene *CFTR.* Atualmente existe uma ampla variedade de técnicas que podem ser

utilizadas para identificar as alterações na sequência do gene *CFTR*; não há um padrão-ouro para os testes (Dequekeret al., 2009). No Brasil, a mutação mais frequente é a F508del, que se caracteriza pela deleção de uma fenilalanina no resíduo 508 da proteína (Marson et al., 2013). Além da F508del, há mais de 2000 outras mutações descritas no gene *CFTR*. No Brasil devido à miscigenação racial, é complexo fazer esse tipo de diagnóstico, além de caro e pouco acessível à maioria dos centros de referência.

1.3 Triagem Neonatal

O diagnóstico precoce pode ser facilitado pelo método de rastreamento e triagem neonatal pelo tripsinogênio imunorreativo elevado no sangue em crianças muitas vezes ainda assintomáticas, tem se mostrado um fator determinante na eficácia do tratamento e sobrevida, contribuindo para melhorar a qualidade de vida, uma vez que possibilita a suspeita diagnóstica mesmo antes das manifestações clínicas (Crossley, Elliott e Smith, 1979). O rastreamento neonatal na FC foi aprovado pelo Ministério da Saúde em 2014 para todo o Brasil, através da dosagem do tripsinogênio imunorreativa (IRT) no teste do pezinho, em duas dosagens, uma entre o 2º e o 7º dia de vida e a outra entre o 16º e 30º dia de vida (Cabello et al., 2003). A quantidade de tripsinogênio imunorreativo na corrente sanguínea de recém-nascidos com FC está prejudicada pela obstrução dos ductos pancreáticos. Assim esses níveis se elevam no sangue, e consistem em marcadores importantes para a triagem. Os resultados falso-positivos e falso-negativos não são incomuns, por isso precisam ser respeitados o intervalo entre os dois testes e confirmado pelo TS ou genético.

1.4 Estudos Bioelétricos

Os estudos bioelétricos realizados em biopsia retal (Sousa M, 2012; Servidoni MF et al, 2013), diferença de potencial nasal (Ooi et al, 2014) e estimulação β-adrenérgica da glândula sudorípara (evaporimetria) (Quinton et al., 2012; Gonska et al., 2009) surgem como nova opção para contribuir para o diagnóstico, uma vez que podem expressar a função do canal da CFTR. As glândulas sudoríparas e a mucosa retal, facilmente acessíveis, podem ser

utilizadas para os estudos eletrofisiológicos. Caracterizam-se pela sua reprodutibilidade e acurácia, que, somados ao TS e quadro clínico, elucidam o diagnóstico da FC *in vivo.*

1.4.1 A Biopsia Retal

A biopsia retal tem a vantagem de ser um exame que acessa o epitélio intestinal do reto, local em que há quantidade abundante de CFTR (Mendes et al., 2004). É um método que já foi validado (Sousa M, 2012) em que se retira o tecido (2-4mm) por sucção ou pinças de biopsias (Hirtz et al.,2004) e o coloca em microcâmaras de *Ussing* para análise do defeito de transporte de íons nestes tecidos recém retirados de sujeitos com FC. No intestino, assim como na mucosa nasal, a secreção de (Cl^-) está alterada, assim como a absorção de (Na^+) aumentada, (Taylor et al., 1987; Mall et al., 1998), todavia a biopsia retal tem a vantagem de no tecido do intestino de FC essa atividade não ser influenciada por inflamações, hemorragias e infecções como ocorre na via aérea.

1.4.2 Diferença de Potencial Nasal

Desenvolvida há aproximadamente 40 anos, a medida de potencial nasal tem sido considerada um importante biomarcador da atividade da CFTR no diagnóstico da FC e no monitoramento experimental de novas terapias para a doença. Essa técnica permite quantificar a função do canal de cloreto e do canal de (Na^+) denominado (ENaC) no epitélio respiratório e a função da CFTR (Solomon GM, 2017). Os últimos consensos reconhecem o DPN como método auxiliar no arsenal diagnóstico de FC e doenças a ela relacionadas (Farrell PM, 2017)

A diferença de potencial (Figura 7) ocorre entre o lado interno (mucosa) e externo das células epiteliais da mucosa nasal, em virtude do aumento no transporte de (Na^+) e ausência ou redução do transporte no canal de cloreto mediado pela CFTR normal ou mutante (Schüler D, 2004). Como é inviável colocar um microeletrodo no lado externo destas células epiteliais, é utilizado um eletrodo subcutâneo como referência. Este método *in vivo* é bastante valioso na distinção entre a FC e sujeitos normais, mas não é indicado para crianças menores de 6 anos de idade (De Boeck K, 2011).

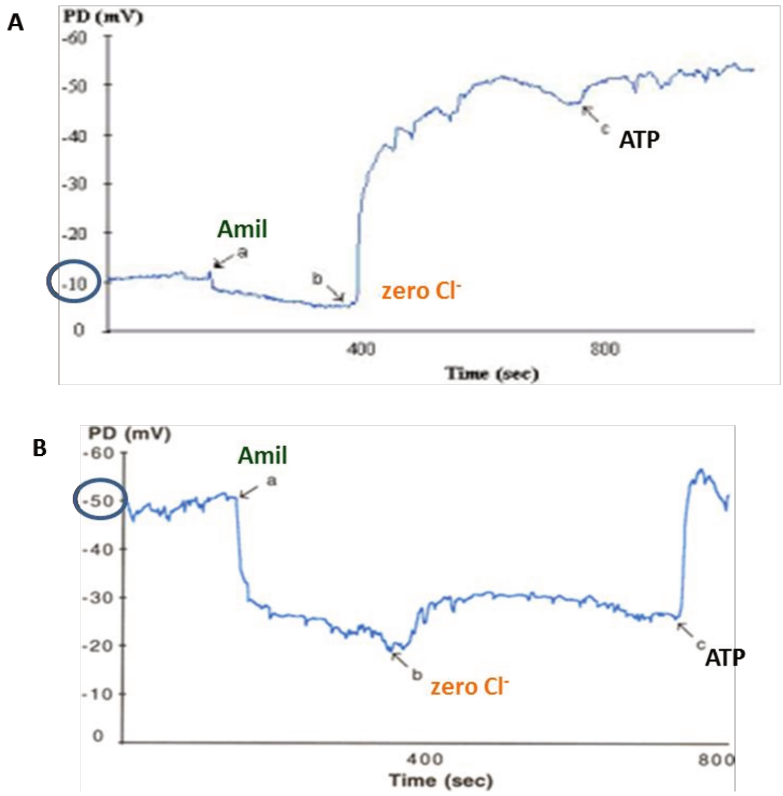


Figura 6. Curvas de resposta da diferença de potencial nasal. A) traçado de indivíduo normal B) traçado de indivíduo com FC onde se observa a DPN basal mais negativa (10mV *vs* -50mV); a) a despolarização maior do potencial em resposta à perfusão do epitélio com uma solução contendo amilorida (droga bloqueadora do canal de Na^+); b) ausência ou menor hiperpolarização do potencial em resposta ao estímulo da secreção do (Cl^-) com o uso de uma solução zero mM de [Cl^-]; e c) ativação menor do canal alternativo de (Cl^-) ativado pelo Ca^{2+} através da aplicação com ATP (comparar a resposta com o traçado do indivíduo normal) (adaptado do site: www.cfmedicine.com).

1.4.3 Teste do evaporímetro: estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara.

A proteína CFTR está diretamente relacionada ao transporte de íons pela membrana celular e uma das suas funções é regular o fluxo de (Cl^-), (Na^+) e água (Mishraet al., 2007). Os ductos sudoríparos foram estudados 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 de (Cl^-) são normalmente reabsorvidos pelos canais da proteína CFTR, regulando os níveis de eletrólitos no suor (Rowe et al., 2005). Sujeitos 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 (Figura 8) (Quinton, 1983; Quinton, 2007).

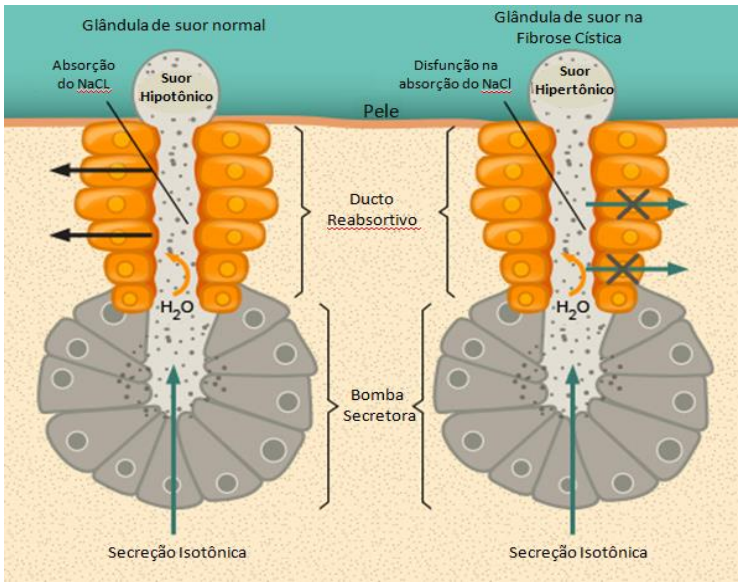


Figura 7. A glândula exócrina de suor. ESQUERDA: Suor normal é secretado, solução isotônica de cloreto de sódio e água é produzida. À medida que o suor passa ao longo do túbulo, cloreto de sódio (NaCl) é reabsorvido nas células dos ductos produzindo uma secreção hipotônica de suor. DIREITA: Na FC, o canal CFTR é incapaz de transportar cloreto para dentro das células do duto produzindo suor com alta concentração de sal (Fonte: http:cftr.info; Quinton, 2007).

Teste do evaporímetro: a estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara baseia-se no princípio de que a glândula sudorípara responde a dois estímulos para a secreção de suor: o colinérgico e o β -adrenérgico. O estímulo colinérgico é responsável pelo controle da temperatura intrínseca do corpo e possui atividade normal nos sujeitos com e sem FC e independe de sexo e idade (Sato e Sato, 1988). Já o estímulo β-adrenérgico, AMPcíclico mediado, funciona como transportador de (Cl^-); e a secreção de suor, determinada por essa via, é diretamente proporcional à atividade da proteína CFTR em sua função como transportador de (Cl^-), estando alterada nos pacientes com FC portadores de uma mutação (heterozigotos) e com doenças relacionadas a FC (Sato&Sato, 1988; Quinton et al., 2012).

O evaporímetro é um aparelho que detecta pequenas quantidades de suor na pele e que foi inicialmente concebido para a realização de testes

dermatológicos porque é sensível e detecta mínimas concentrações de suor (Kim, J et al 2016). O sensor colocado sobre a pele mede a taxa de transpiração através da perda de água transdermal (g $H_2O/m^2/h$) que é registrada através de um gráfico computadorizado (Salinas, et al 2017)

A atividade da proteína CFTR pode ser medida através da detecção de quantidades mínimas de suor realizada pelo evaporímetro. O aparelho é composto por dois sensores. No sensor teste é feita a injeção intradérmica (ID) de carbacol (CCH) que estimulará inicialmente a secreção de suor por via colinérgica; depois esta via é inibida com a aplicação de atropina; e por fim, é feita a aplicação de um beta-coquetel, composto por atropina e isoproterenol, associado à aminofilina, que será responsável pela estimulação da CFTR como canal de (Cl^-). No sensor controle é aplicada injeção somente de atropina no momento do exame para servir como referência de linha de base. Após cada aplicação é realizada a medição constante de suor pelo equipamento durante 8 a 10 minutos (Quinton P, 2012).

Nos estudos existentes, os pacientes portadores de FC não apresentaram sudorese após o estímulo com o beta-coquetel; os pacientes com uma mutação apresentaram cerca de 50% da média de sudorese quando comparada a fase colinérgica; e os pacientes sem nenhuma mutação tiveram uma curva de sudorese semelhante à da fase colinérgica. Os pacientes com doenças relacionadas apresentaram sudorese abaixo da média de 50%, mas acima de 0%, o que os diferem dos FC. É realizado cálculo da relação de sudorese pelo estímulo β-adrenérgico e a sudorese pelo estímulo colinérgico (razão β-adrenérgico/colinérgico) (Quinton et al; 2012).

Os estudos que determinaram os valores normais da relação estimulação β-adrenérgica/estimulação colinérgica (Tabela 1) foram realizados na população norte americana.

	COLINÉRGICA		B-ADRENÉRGICA		RAZÃO B/COL	
SAUDÁVEL						
HOMENS (34)	70 (65,75)	P=0,003	57 (52,62)	P<0,001	0,8 (0,7,0,9)	P=0.8
MULHERES (19)	57 (50, 63)		40 (35,46)		0,8 (0,7,0,9)	
HETEROZIGOTOS						
HOMENS (12)	65 (55,76)	P=0,02	44 (36,51)	P<0,001	0,6 (0,5, 0,7)	P<0.001
MULHERES (28)	51 (44,57)		16 (11,20)		0,3 (0,3, 0,4)	
FIBROSE CÍSTICA						
HOMENS (23)	69 (62,76)	P=0,35	-1,6 (-2,2, -0,1)	P=0,38	-0,02 (-0,04, -0,01)	P=0.9
MULHERES (17)	60 (51, 68)		-1,2 (-1.9 ,-0.5)		-0,03 (-0,04, -0,01)	
P VALOR	P=0.9		P<0.001		P<0.001	

Tabela 1. Valores de referência de evaporimetria da população norte americana. (Adaptado de Quinton, P., Molyneux, L., Ip, W., Dupuis, A., Avolio, J., Tullis, E., Gonska, T. (2012). β-adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med., 186(8), 732–9).

Hoje sabemos que a FC é um espectro de doenças, que além da forma não clássica com manifestações mais leves, podem se confundir com as doenças relacionadas à CFTR (Boyle, 2003; De Boek *et al,* 2017).

Em ambos os casos, o TS habitualmente não é suficiente para elucidação diagnóstica necessitando de confirmação pelos outros testes já discutidos. Todavia os parâmetros de normalidade destes testes devem ser estudados e estabelecidos para cada população, uma vez que o ambiente, a alimentação, a miscigenação racial, o predomínio de mutações dentre um povo pode resultar em dados diferentes.

Os estudos de referência da estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara, foram realizados na população do Canadá e Estados Unidos, e os valores de normalidade, podem não ser os mesmos de um país com uma população miscigenada e clima tropical como a do Brasil, o que torna esse estudo necessário e inovador.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer os valores de secreção de suor, por estimulação β-adrenérgica, em uma amostra de conveniência, composta por adultos saudáveis, de uma população brasileira da cidade de Campinas/SP.

2.2. Objetivos Específicos

i. Relacionar os valores encontrados na evaporimetria com os encontrados no teste do suor clássico.

ii. Avaliar a variabilidade de acordo com sexo, idade, membro dominante, período menstrual, prática de atividade física, umidade e temperatura ambiente.

iii. Realizar o sequenciamento genético e espirometria destes sujeitos a fim de identificar e/ou excluir possíveis mutações no gene *CFTR* e presença de outras doenças pulmonares associadas.

iv. Avaliar a percepção individual durante a realização do teste quanto ao desconforto (duração, posição e sensação de dor).

3. Métodos

3.1 Desenho

Estudo experimental, de corte transversal, realizado no período de abril de 2016 a novembro de 2017, em 60 pacientes (30 mulheres e 30 homens) hígidos, com idade entre 18 e 70 anos, com mediana de idade de 26 anos, selecionados de forma aleatória, sem doenças respiratórias (afastada pela entrevista e espirometria), cardíacas, dermatológicas, ou outras comorbidades sistêmicas e neurológica.

Os pacientes foram entrevistados e convidados a se submeter aos testes de: espirometria; evaporimetria e TS, ambos em duplicata, nos braços direito e esquerdo e a coleta de sangue para estudo genético, nessa sequência. Após a coleta dos dados os resultados da evaporimetria foram analisados e comparados com os do TS. Os dados obtidos com os testes do suor e evaporimetria, confirmados pela análise genética, serviram para excluir 3 sujeitos com possíveis mutações relacionadas à CFTR. Como resultado obtivemos dados que nos permitiram traçar uma amostra dos resultados de evaporimetria em 57 sujeitos (sem nenhuma mutação no gene *CFTR*), em uma população da cidade de Campinas/SP, e compará-los com os existentes obtidos na população norte-americana e canadense (Figura 8).

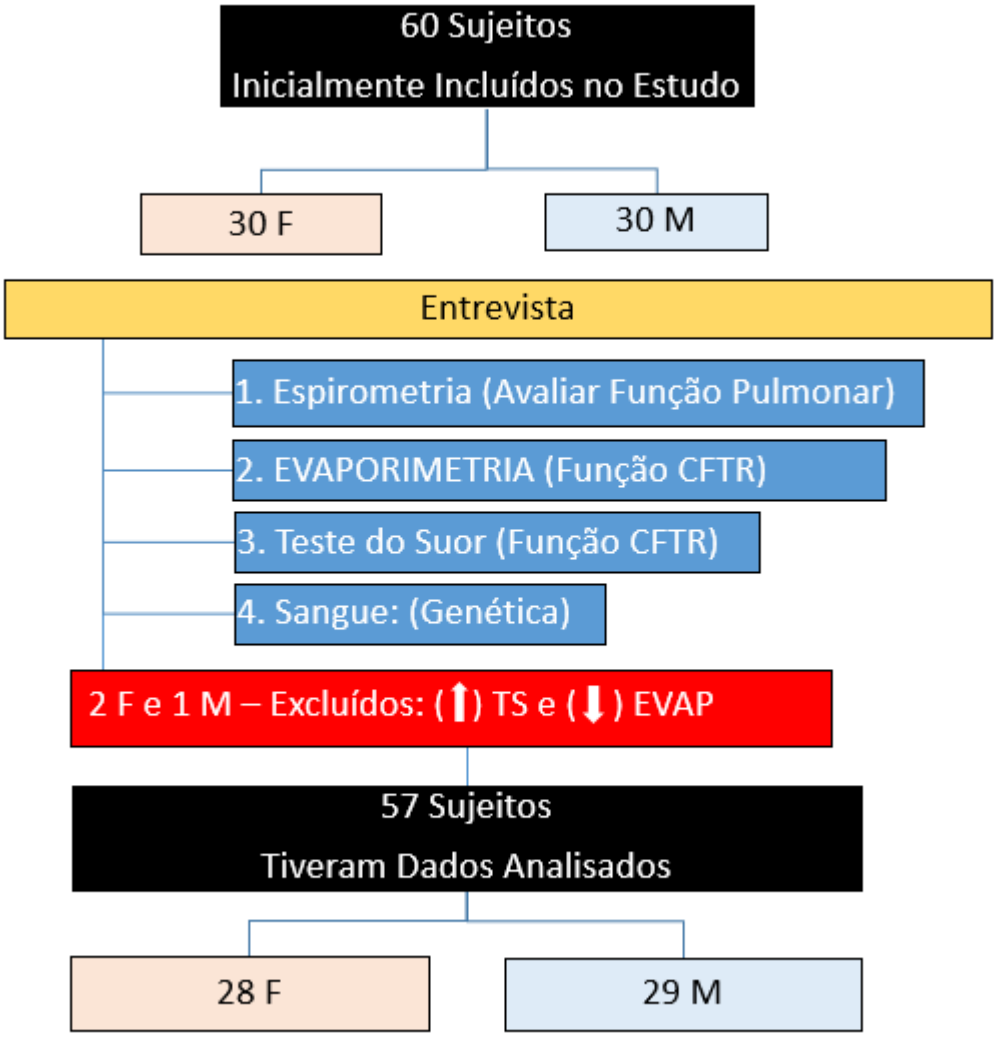


Figura 8. Desenho do estudo.

3.2 Seleção dos Sujeitos

Foram convidados a participar do estudo 60 sujeitos hígidos, 30 do sexo feminino e 30 do sexo masculino, com idades de 18 a 70 anos, com mediana de idade de 26 anos, sem doenças respiratórias (afastadas pela entrevista e espirometria), dermatológicas, cardíacas, ou história de outras comorbidades sistêmicas, neurológicas e FC na família, que aceitaram participar do estudo.

Consentiram sua participação após aplicação e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – ANEXO I).

O projeto foi enviado ao comitê de ética e pesquisa da UNICAMP e só teve início após sua aprovação (CAAE: 13.215913.5.0000.5404 parecer

#233.183 – ANEXO II). Mediante seu aceite, receberam esclarecimentos da pesquisadora responsável e explicações sobre todos os procedimentos do estudo, incluindo os possíveis benefícios e riscos.

Ficou assegurada a preservação da identidade de todos os participantes.

3.3 Critério de Inclusão

Indivíduos convidados pela pesquisadora que se declararam hígidos, não tabagistas, que consentiram formalmente mediante a assinatura do TCLE.

3.5 Coleta de dados e marcadores avaliados

As coletas dos dados pessoais dos participantes desta pesquisa foram efetuadas a partir da entrevista realizada pela pesquisadora responsável através do preenchimento de uma ficha clínica (ANEXO-III) após assinatura do TCLE, durante o período de abril de 2016 a novembro de 2017 no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da Unicamp em uma sala climatizada. Os seguintes marcadores foram avaliados: (i) sexo (masculino e feminino); (ii) idade (anos); (iii) etnia autodeclarada; (iv) peso (Kg); (v) altura (m); (vi) índice de massa corporea (kg/m2); (vii) braço dominante (esquerdo ou direito); (viii) menstruação (menstruada; menopausa; pré ou pós período de menstruação); (ix) atividade física (sedentário; praticante de atividade física); (x) função pulmonar pela espirometria (Capacidade vital forçada (CVF); volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF (VEF1%); fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF (FEF25-75%)); (xi) umidade do ambiente (%); (xii) temperatura do ambiente (ºC); (xiii) escala visual analógica (EVA) para a dor (JENSEN MP,1986).

3.6 Procedimentos

3.6.1 Teste do Evaporímetro: Estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara

O teste da evaporimetria foi realizado primeiramente no BD e depois no BE, seguindo o mesmo procedimento e o padrão de procedimento operacional (ANEXO IV). Depois da preparação da pele: limpeza da região proximal do antebraço com água destilada e, se necessária, remoção de excesso de pêlo, foi aplicado uma fina camada de óleo mineral na área a ser examinada para diminuir a perda de água. Os dois sensores do evaporímetro foram colocados sobre a superfície palmar do antebraço e fixados por tiras de borracha conforme Figura 9.

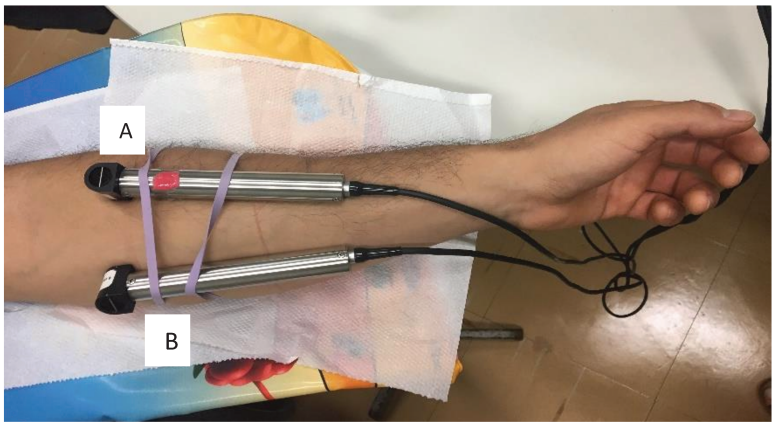


Figura 9. Demonstração da colocação e posicionamento dos sensores (A e B) no antebraço do paciente.

O sensor que ficava acima da superfície da pele foi mantido em contato, tocando a superfície da pele enquanto media a taxa de evaporação. No estudo,

foi utilizado o Evaporímetro CyberDerm RG-1 (Dasylab, Broomall, PA, EUA) – Figura 10.

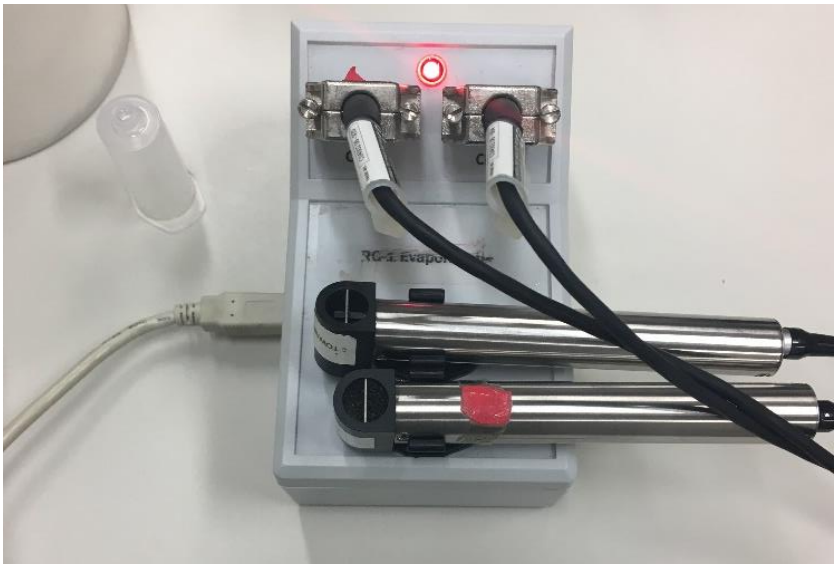


Figura 10. Aparelho Evaporímetro CyberDerm RG-1 (Dasylab, Broomall, PA, EUA).

Foi feita uma injeção intradérmica com agulha de tamanho 30-G de 0,2 mL de atropina, medicamento anticolinérgico, para inibir a transpiração temorregulativa numa área da pele (Figura 11). Isso teve o objetivo de determinar a "linha de base" de transpiração. Simultaneamente foi realizada a estimulação e inibição de suor em uma área de "teste" adjacente. As medicações foram obtidas na farmácia do Hospital das Clínicas da UNICAMP tendo sua procedência e qualidade garantidas pelos órgãos fiscalizadores e normas da ANVISA. Os medicamentos foram preparados no dia do teste e utilizadas dentre 3 horas após o preparo.

Avaliação da secreção de suor com o evaporímetro:

a) Injeção intradérmica de 0,1 mL de carbacol (corresponde a 0.01 µg) para a estimulação colinérgica da secreção de suor.

b) Injeção intradérmica de 0,2 mL de atropina (corresponde a 4.4 µg) para inibir a secreção de suor colinérgica

c) Injeção intradérmica de 0,2 mL do coquetel de estimulação β-adrenérgico do suor composto por atropina (8 µg) + isoproterenol (4 µg) + aminofilina (0,9 mg).

Figura 11. Injeção intradérmica de 0,2 mL de atropina.

O teste foi acompanhado em tempo real pela pesquisadora, que monitorizava o traçado da curva que o programa gerava (Figura 12.A) e anotava os valores a cada minuto em uma ficha de exame (ANEXO V). O procedimento total durou aproximadamente de 30 min a 40 min por braço.

O laudo final foi automatizado através de um programa de computador desenvolvido em parceria com a equipe de engenharia do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), campus Campinas, (Figura 12B).

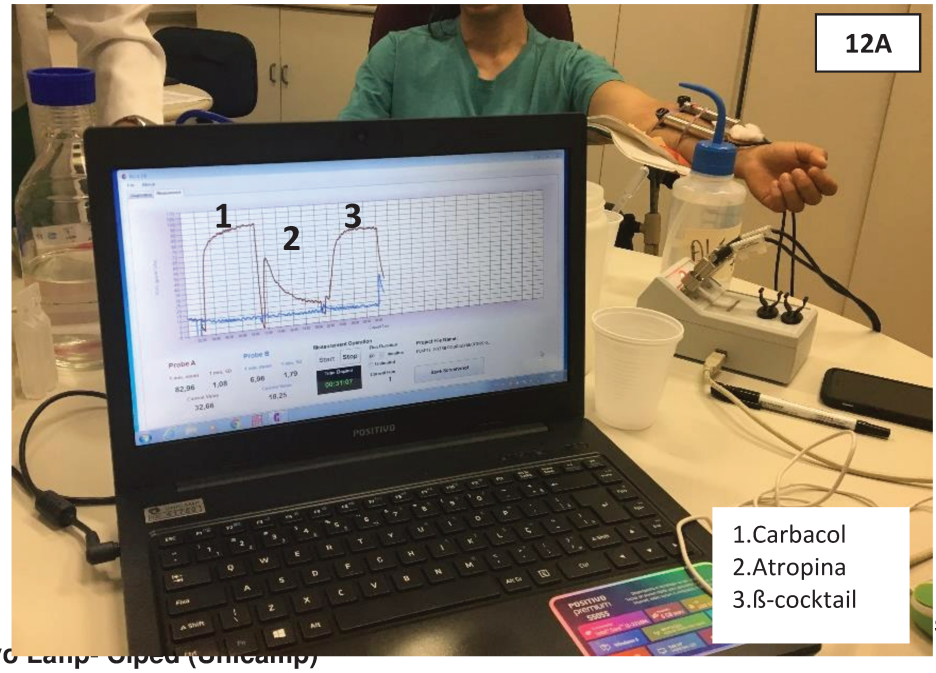


Figura **software.**
Arquivo Lafip- Ciped (Unicamp)

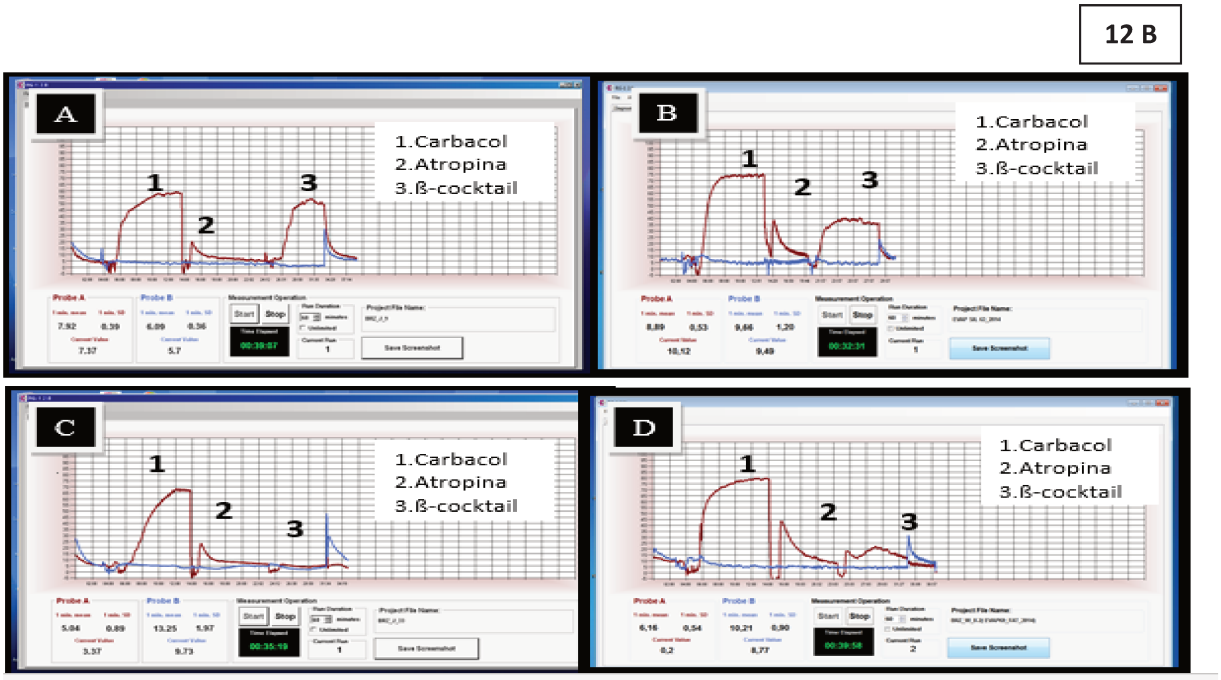


Figura 12 B. Imagens gerada no laudo do paciente: (A) Controle saudável, (B) Heterozigoto, (C) Portador de FC e (D)) CFTR – RD Portador de doença relacionada. Arquivo Lafip- Ciped (Unicamp).

3.6.2 Teste do suor clássico

O teste foi realizado nos dois braços ao final do teste da evaporimetria, em uma região mais distal do antebraço. Após limpeza com álcool e água

destilada, o método de Gibson e Cooke foi realizado nas três etapas do TS: estimulação, coleta e dosagem do (Cl^-).

O estímulo do suor foi realizado pela iontoforese com gaze com pilocarpina; a distância de cinco centímetros entre os eletrodos foi adotada para todos os participantes. Para minimizar o risco de queimadura, a gaze foi mantida completamente úmida com o uso de pilocarpina 0,5% e o eletrodo fixado sobre a gaze, com o uso de uma pulseira elástica, para evitar seu deslocamento no braço.

Após estimulação, para coleta do suor, utilizou-se um papel de filtro de 17,5 cm^2 coberto com plástico e atadura de crepe. A [Cl^-] foi obtida por titulação manual de acordo com a técnica de Shales e Shales (Shales e Shales 1941).

No TS foi utilizado o tempo de 10 min e de 30 min para estimulação e coleta do suor, respectivamente (Figura 13 A e B).

No TS a quantidade suficiente de suor obtida durante a sudorese induzida foi de peso superior a 75 mg) e parâmetros de diagnóstico de FC (sujeitos saudáveis = [Cl^-] ≤ 30 mEq/L; valores limítrofes = [Cl^-] ≥ 30 mEq/L a ≤ 59 mEq/L; FC = [Cl^-] ≥ 60 mEq/L (Farrel et al., 2017).

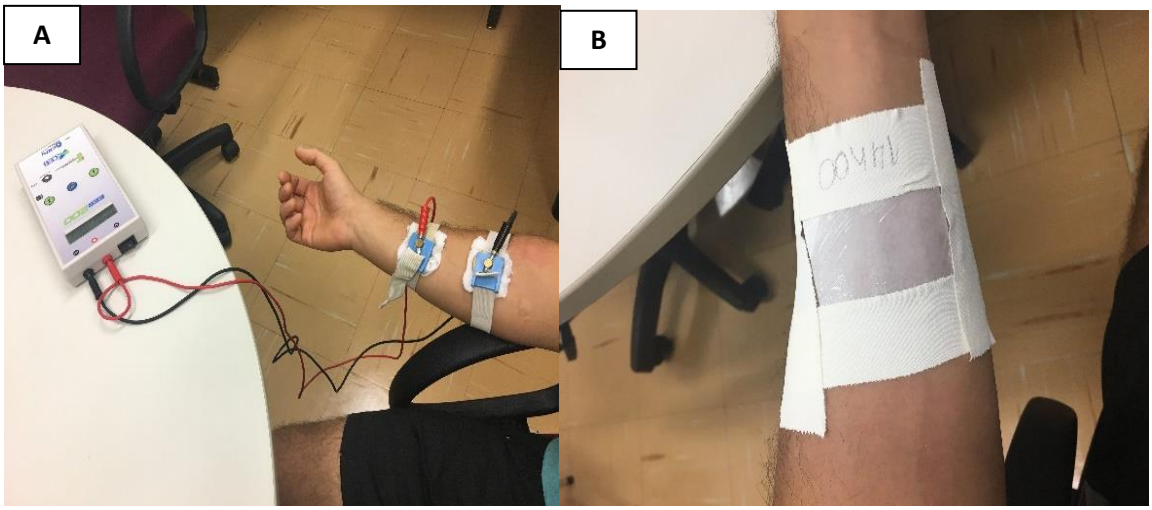


Figura 13. (A) Estímulo da sudorese por iontoforese, (B) coleta do suor utilizando papel de filtro. Arquivo Lafip- Ciped (Unicamp).

3.6.3 Espirometria

A espirometria foi realizada no espirômetro modelo CPFS/D (MedGraphics, Saint Paul, Minnesota, EUA). Os dados foram registrados pelo software BREEZE

PF Versão 3.8 B for Windows 95/98/NT, segundo normatização disponível na literatura referenciada (MILLER MR, 2005; PEREIRA CA, 2007) e realizada no Laboratório de Função Pulmonar (LAFIP) do CIPED. Para o exame, o participante permaneceu sentado utilizando clipe nasal e foi solicitada a realização de manobra expiratória vigorosa e prolongada, de maneira a atingir o critério de reprodutibilidade da manobra de CVF (Figura 14). O equipamento foi calibrado imediatamente antes da realização do primeiro exame do período da manhã.

Os seguintes marcadores foram avaliados: (i) capacidade vital forçada (CVF): diferença de volume entre a inspiração máxima e a expiração completa, medidas ao nível da boca, realizada rapidamente e com esforço máximo, medida em litros. Obtida solicitando-se que o participante realize uma inspiração máxima, até o nível da capacidade pulmonar total, seguida por uma expiração rápida e intensa, mas prolongando sua duração, até que todo o ar fosse expirado;(ii) volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF (VEF1%): volume de ar expirado, em litros, durante o primeiro segundo da CVF, sendo obtido a partir da manobra para obtenção da CVF;(iii) fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF (FEF25-75%): fluxo de ar eliminado durante a parte central da CVF, medido em litros por segundo (L/seg).

Figura 14. Realização da Espirometria. Arquivo Lafip- Ciped (Unicamp).

3.6.4 Estudo Genético

Um total de 10 mL de sangue venoso foi coletado e enviado ao laboratório de genética médica e medicina genômica. Na análise genética foi realizada à

amplificação dos fragmentos do DNA contendo as regiões codificantes do *CFTR* e as junções intron/exon. O gene *CFTR* é composto por 27 exons, porém como o exon 13 possui grande dimensão, ele foi amplificado em 2 fragmentos (13.1 e 13.2). As condições da amplificação de cada um dos 28 fragmentos foram otimizadas para o volume final de 50 µL contendo 50 ng de DNA, 10 picomoles de cada iniciador, 1,5 U de Taq e concentrações finais de 1,5 mM de $MgCl_2$, 80 µM de cada desoxirribonucleotídeo e tampão 1X com KCl [50mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,4; 0,08% (v/v) de Nonidet P40] ou 1X tampão com $(NH_4)_2SO_4$ [20 mM de $(NH_4)_2SO_4$; 75 mM de Tris-HCl pH 8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20]. As reações foram realizadas em paralelo com uma amostra de DNA controle.

A sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tampão e tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos na Tabela 2. Condições para amplificação dos fragmentos de DNA do gene *CFTR* – triagem da presença de variantes

sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tampão e tamanho dos fragmentos				
Fragmento	**Iniciadores (5'-3')**	**Tampão**	**T – anelamento**	**pb**
1	S: CGT AGT GGG TGG AGA AAG C AS: CCT TTA CCC CAA ACC CAA CC	$(NH_4)_2SO_4$*	64,6	392
2	S: ATT CCA AAT CTG TAT GGA GAC C AS: GTT GGG ATT ACA GGC ATT AGC	KCl	60,5	315
3	S: AGA TAT CTG GCT GAG TGT TT AS: TGT GAT ACA TAA TGA ATG TAC	KCl	56	318
4	S: TGT GTT GAA ATT CTC AGG GT AS: TTG TAC CAG CTC ACT ACC T	KCl	61	376
5	S: ATT TCT GCC TAG ATG CTG GG AS: AAC TCC GCC TTT CCA GTT GT	KCl	64	395
6a	S: TTA GTG TGC TCA GAA CCA CG AS: CTA TGC ATA GAG CAG TCC TG	KCl	56	386
6b	S: TGG AAT GAG TCT GTA CAG CG AS: GAG GTG GAA GTC TAC CAT GA	KCl	63	415
7	S: AGA CCA TGC TCA GAT CTT CCA T AS: GCA AAG TTC ATT AGA ACT GAT C	KCl	60,5	410
8	S: TGA ATC CTA GTG CTT GGC AA AS: TCG CCA TTA GGA TGA AAT CC	KCl	55	359
9	S: GTC CTC TAG AAA CCG TAT GC AS: ACT ACA CCC ATA CAT TCT CC	$(NH_4)_2SO_4$*	65	500
10	S: GCA GAG TAC CTG AAA CAG GA AS: CAT TCA CAG TAG CTT ACC CA	KCl	61	491
11	S: CAA CTG TGG TTA AAG CAA TAG TGT AS: GCA CAG ATT CTG AGT AAC CAT AAT	KCl	60	425
12	S: GTG AAT CGA TGT GGT GAC CA AS: CTG GTT TAG CAT GAG GCG GT	KCl	61	426
13.1	S: TGC TAA AAT ACG AGA CAT ATT GC AS: ATC TGG TAC TAA GGA CAG	KCl	60,5	528
13.2	S: TCA ATC CAA TCA ACT CTA TAC G AS: TAC ACC TTA TCC TAA TCC TAT GAT	KCl	58	498
14a	S: AAA AGG TAT GCC ACT GTT AAG AS: GTA TAC ATC CCC AAA CTA TCT	KCl	56	512
14b	S: GAC CCA GGA ACA CAA AGC A AS: GTC ACC TCA CCC AAC TAA TG	KCl	59,5	365
15	S: CGA TTT TGA GGT TAA GGG TGC AS: AAG GCA CAT GCC TCT GTG CA	KCl	63	483
16	S: AAT GCG TCT ACT GTG ATC CA AS: TGT GGG ATT GCC TCA GGT TT	KCl	61	401
17a	S: ATC ACT GAC ACA CTT TGT CC AS: CCA AAA TGA AGT CAC ATG GT	KCl	61	440
17b	S: ATT CAA AGA ATG GCA CCA GT AS: GAT AAC CTA TAG AAT GCA GC	$(NH_4)_2SO_4$*	51	464
18	S: AAT GTG ATA TGT GCC CTA GG AS: ACA GAT ACA CAG TGA CCC TC	KCl	59,5	342
19	S: GCC CGA CAA ATA ACC AAG TG AS: GCT AAC ACA TTG CTT CAG GCT	KCl	64	454
20	S: GGT CAG GAT TGA AAG TGT GCA AS: CTA TGA GAA AAC TGC ACT GGA	KCl	64	401
21	S: AAT GTT CAC AAG GGA CTC CA AS: CAA AAG TAC CTG TTG CTC CA	KCl	59	476
22	S: AAA CGC TGA GCC TCA CAA GA AS: TGT CAC CAT GAA GCA GGC AT	KCl	64	565
23	S: GTG GCT AAC GCT ATA TCA AC AS: ACA TGG CTC AGA TCA AAG TG	KCl	59,5	436
24	S: GGA CAC AGC AGT TAA ATG TG AS: CAT GTC AAC ATT TAT GCT GC	KCl	63	386

Tabela 2. sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, tampão e tamanho dos fragmentos. **T, temperatura; S, iniciador senso; AS, iniciador antissense; pb, pares de**

bases. *, adição de 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) na reação. Após a amplificação, a qualidade da reação foi avaliada pela aplicação de 3 µL da reação em cadeia da polimerase em gel de agarose a 1,5% (80V/30 min). A segunda etapa da análise genética consistiu na avaliação dos fragmentos amplificados por SSCP (polimorfismo conformacional de fita simples) e, por posterior sequenciamento, caso alguma alteração fosse encontrada [21]. No método comparativo de SSCP, 1 µL de cada produto reação de amplificação do DNA foi diluído em 10 µL de tampão desnaturante (98% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% xilenocianol). Após a desnaturação a 95°C durante 5 min, as amostras foram armazenadas a 0ºC e, em seguida, aplicadas no gel de acrilamida: bisacrilamida (37.5: 1) 12,5%. As amostras foram eletroforisadas em cuba vertical, sob 10ºC em 0,5 x tampão TBE (45 mM Tris-borato, pH 8, e 1 mM EDTA), durante um período de 6 horas. Os géis foram corados com prata.

.

3.7 Avaliação Qualitativa

Na avaliação qualitativa do teste os participantes foram questionados quanto a posição em que permaneceram durante a realização do teste, a duração do teste e a sensação de dor ou desconforto após cada uma das injeções aplicadas e uma impressão geral ao final dos dois testes. Estes relatos foram anotados na ficha clínica após a realização do exame em cada braço para comparar se havia diferença entre eles. Também foi observada a qualidade da bolha formada após a aplicação de cada injeção sempre pelo mesmo pesquisador.

Quanto a avaliação da dor foi usada a escala visual analógica de dor (EVA - ANEXO VI) após cada uma das 4 injeções aplicadas. Os sujeitos classificam a dor numa escala de 0 a 10 sendo de 0 a 3 uma dor leve, de 3 a 7 uma dor moderada e de 8 a 10 uma dor intensa (Jensen MP, 1986).

3.8 Análise dos Dados

A análise descritiva está apresentada pela frequência relativa e frequência absoluta para os dados categóricos e pela mediana (percentil 25th e percentil 75th); intervalo de confiança de 95% para a mediana, para os dados com distribuição numérica. A normalidade dos dados numéricos foi avaliada pelas seguintes técnicas: (i) análise de medidas descritivas para tendência central; (ii) método gráfico (gráfico Q-Q normal, gráfico Q-Q sem tendência e boxplot; (iii) método por teste estatístico (testes de normalidade): Kolmorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

A associação do marcador categórico (variável independente) com os marcadores numéricos (variável dependente) para 2 grupos foi realizada pelo

teste U de Mann-Whitney para amostras independentes, e na presença de 3 grupos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para amostras independentes. Adicionalmente, a análise estatística foi realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de amostras relacionadas quando os marcadores foram comparados entre si (grupos pareados).

Os valores numéricos obtidos foram correlacionados entre si pelo teste de correlação de Spearman. Na correlação, foram considerados como ponto de corte: (fraca) 0,2 a 0,4; (moderada) 0,4 a 0,7; (forte) 0,7 a 0,9.

A análise de regressão linear foi realizada entre as diferenças das medidas (y-axis = [medida 1 – medida 2]) e a média das medidas (x-axis = [medida 1 + medida 2]/2) para análise de viés associado a diferença entre os dados por meio do gráfico de Bland-Altman, tendo como parâmetro de comparação os valores mensurados entre os braços (direito versus esquerdo). No gráfico de Bland-Altman, apresentamos o valor absoluto do dado, o valor do viés, os limites de concordância, o intervalo de confiança para os limites de concordância e a curva ajustada para a regressão linear. Para dar suporte na interpretação dos achados, a média aritmética do viés (resíduo) e o intervalo de confiança para essa medida, foram apresentados. Concomitantemente, o coeficiente de correlação intraclasse foi mensurado para os dados da função da CFTR entre os braços.

A análise estatística foi realizada no software Statistical Package for the Social Sciences (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp) e no MedCalc Statistical Software version 16.4.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2016). Nas análises foi considerado o valor de alpha de 0,05. Nenhuma técnica foi utilizada para lidar com os ajustes para “missing data” sendo que todos os dados foram coletados de todos os participantes.

4. Resultados

4.1. Análise descritiva dos marcadores e dados obtidos na avaliação da função da CFTR

Foram incluídos no estudo 60 participantes. Destes 57/60 (95%) permaneceram. Os 3 participantes excluídos apresentaram valor ≥ 60 mEq/L para a [Cl^-] no teste do suor e evaporimetria. Dentre os 3 participantes, 1 não foi sequenciado por não ter quantidade de DNA suficiente e 2 apresentaram variantes no gene *CFTR* [F1052V (Phe1052Val; c.3154T>G; rs150212784 de significado incerto) /Desconhecido; F508del (p. Phe508delPhe; c.1521_1523delCTT; rs113993960 com caráter de patogênica) /L997F (p. Leu997Phe; c.2991G>C; rs1800111 de significado incerto)].

Dos 57/60 sujeitos incluídos, 29 (50,9%) eram do sexo masculino e 28 (49,1%) do feminino, com idade entre 18 e 70 anos e mediana de 28 anos. Dezenove (33,3%) sujeitos tinham menos de 25 anos, 27 (47,4%) entre 26 e 40 anos, e 11 (19,3%) tinham idade acima de 41 anos.

Participaram do estudo 41 (71,9%) representantes da etnia branca, 12 (21,1%) da parda, 3 (5,3%) da negra e 1 (1,8%) da amarela.

Quanto a naturalidade, 48 (84,2%) sujeitos eram do Estado de São Paulo, 4 (7,0%) de Minas Gerais, 2 (3,5%) do Rio de Janeiro, 1 (1,8%) de Alagoas, 1 (1,8%) da Bahia e 1 (1,8%) do Pará. Todos residentes da cidade de Campinas/SP no período do estudo.

Quanto à classificação do índice de massa corporal (IMC) segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 22 (38,6%) sujeitos eram eutróficos, 22 (38,6%) estavam com sobrepeso, 12 (21,1%) sujeitos eram obesos e apenas 1 (1,8%) participante estava com baixo peso.

Quanto aos antecedentes familiares, 28 (49,1%) participantes alegaram possuir antecedentes familiares, sendo eles: hipertensão, cardiopatias, acidente vascular encefálico e Alzheimer, enquanto 29 (50,9%) negaram estes antecedentes. Nove (15,8%) sujeitos afirmaram possuir comorbidades dentre elas: hipertensão, diabetes e alergia alimentar, os demais, 48 (84,2%) negaram.

Do total de 57 participantes, 18 (31,6%) alegaram estar fazendo uso de alguma medicação (anti-hipertensivo, anticoncepcional, inibidor de bomba de prótons, e antidepressivos) enquanto que 39 (68,4%) negaram.

A prática de atividade física é frequente, pelo menos uma vez por semana na vida de 30 (52,6%) indivíduos, enquanto 27 (47,4%) se consideraram sedentários, sem nenhuma prática de atividade física.

Dentre os participantes, 50 sujeitos (87,7%) possuíam dominância do BD, enquanto 7 (12,3%) do BE.

Quanto ao período menstrual das 28 mulheres que participaram do estudo, 21 (75%) afirmaram estar no período pré ou pós-menstrual, 4 (14,28%) afirmaram estarem menstruadas no momento do exame e 3 (10,72%) já estavam na menopausa.

Quanto aos valores do teste do suor sabe-se que os valores de $[Cl^-]$ < 30mmol/L são considerados normais, que valores de $[Cl^-]$ > 60mmol/L são considerados anormais (Farrell & Koscik, 1996), e os valores entre 30mmol/L e 59mmol/L são limítrofes (De Boeck, et a 2017). Na Tabela 3, abaixo, consta os resultados dos números de teste de suor encontrados por grupo e braço (direito e esquerdo). Os valores de cada teste encontram-se em Tabela no ANEXO VII.

Teste de Suor	$[Cl^-]$mmol/L	BRAÇO D	BRAÇO E	TOTAL
HOMENS	< 30mmol/L*	18	13	31
	30 a 59 mmol/L**	11	16	27
	≥60 mmol/L***	1	1	2
	Total	30	30	60
	< 30mmol/L*	22	16	38

MULHERES	30 a 59 mmol/L**	6	12	18
	≥60 mmol/L***	2	2	4
	Total	30	30	60

Tabela 3. Resultados dos testes de suor por grupo normal *, limítrofes e anomais***, como os testes foram realizados em duplicada (BD e esquerdo) tivemos um total de 120 testes de suor. Os sujeitos com testes ≥60 mmol/L foram excluídos.**

A descrição dos dados (categóricos e numéricos) clínicos, demográficos e laboratoriais dos participantes estão resumidos na Tabela 4.

Descrição dos dados (categóricos e numéricos)		
Marcador	**Grupo**	**Distribuição***
Sexo	Masculino	29/57 (50,9%)[a]
Etnia autodeclarada	Caucasoide	41/57 (71,9%) [a]
Idade (anos)	≤ 25 anos	19/57 (33,3%) [a]
	26 a ≤ 40 anos	27/57 (47,4%) [a]
	> 40 anos	11/57 (19,3%) [a]
	Total	28 (23,50 a 35)[b]
Naturalidade	São Paulo	48/57 (84,2%) [a]
Peso (Kg)	Total	78 (63,5 a 86,50) [b]
Altura (m)	Total	1,67 (1,62 a 1,78) [b]
ÍMC (kg/m^2)	Baixo peso	1/57 (1,8%) [a]
	Eutrófico	22/57 (40,4%) [a]
	Sobrepeso	22/57 (40,4%) [a]
	Obesidade	12/57 (21,1%) [a]
	Total	26,51 (22,54 a 28,93) [b]
Braço dominante	Direito	50/57 (87,7%) [a]
Menstruação	Não se aplica (masculino)	29/57 (50,9%) [a]
	Menstruada	4/57 (7%) [a]
	Menopausa	3/57 (5,3%) [a]
	Pré ou pós menstruação	21/57 (36,8%) [a]
Atividade física	Ativo	30/57 (52,6%) [a]
	Sedentário	27/57 (47,4%) [a]
Medicação em uso	Não	39/57 (68,4%) [a]

Antecedentes familiares	Não	29/57 (50,9%) [a]
Comorbidades	Não	48/57 (84,2%) [a]
Diagnóstico para teste do suor	Normal (< 30 mEq/L)	33/57 (57,9%) [a]
	Borderline (≥ 30 a 60 mEq/L)	24/57 (42,1%) [a]
Função pulmonar		
VEF_1 (L)	Total	3,44 (3,08 a 4,33) [b]
VEF_1 (%)	Total	103 (90 a 108) [b]
CVF (L)	Total	4 (3,47 a 4,99) [b]
CVF (%)	Total	99 (90 a 106) [b]
VEF_1/CVF (L)	Total	0,87 (0,83 a 0,88) [b]
VEF_1/CVF (%)	Total	89 (80 a 90) [b]
$FEF_{25\%-75\%}$ (L)	Total	4,05 (3,19 a 4,40) [b]
$FEF_{25\%-75\%}$ (%)	Total	97 (80,50 a 110) [b]
Dados ambiente laboratorial	**Momento do teste**	
Umidade do ambiente (%)**	Braço esquerdo	42,80 (37,33 a 50,24) [b]
	Braço direito	49 (43,23 a 55,12) [b]
Temperatura do ambiente (ºC)***	Braço esquerdo	27,79 (26,65 a 28,82) [b]
	Braço direito	26,50 (23 a 28,33) [b]

Tabela 4 Descrição dos dados (categóricos e numéricos) clínicos, demográficos e laboratoriais dos participantes do estudo.*[a], dados categóricos apresentados pela frequência absoluta e relativa; [d]dados numéricos apresentados pela mediana (percentil 25[th] e percentil 75[th]), FEV_1, volume expiratório forçado no primeiro segundo da capacidade da vital forçada; FVC, capacidade vital forçada; $FEF_{25-75\%}$, fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da capacidade vital forçada; L, litros; %, porcentagem do predito. **, umidade foi maior no momento da realização do exame no braço direito (p-value < 0,001); *, temperatura foi maior no momento da realização do exame no braço esquerdo (p-value < 0,001). Análise estatística realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de amostras relacionadas. Alpha = 0,05.**

Todos os participantes concluíram os testes de evaporimetria, ou seja, obteve-se 120 resultados de estimulação β-adrenérgica da CFTR na glândula sudorípara. A partir dos resultados, foram calculadas as médias das razões β-adrenérgico/colinérgico, ou seja, os valores obtidos através do cálculo: [(βcook pico – mínimo atropina) / (CCh pico – mínimo atropina)]. A descrição dos dados referentes a indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico, [Cl^-] no teste do suor e avaliação da dor está apresentada a seguir:

4.2. Comparação entre os braços avaliados para os exames e entre a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e teste do suor

Na comparação entre braços (direito versus esquerdo) para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e teste do suor, houve valores equivalentes para o pico do estímulo colinérgico (p-value =

0,525) e pico do estímulo β-adrenérgico (p-value = 0,120). No entanto, o mesmo não ocorreu para a razão β-adrenérgico/colinérgico e [Cl^-] no teste do suor (p-value < 0,05), sendo ambos com maiores valores no braço esquerdo (Figura 15 A, B, C, D).

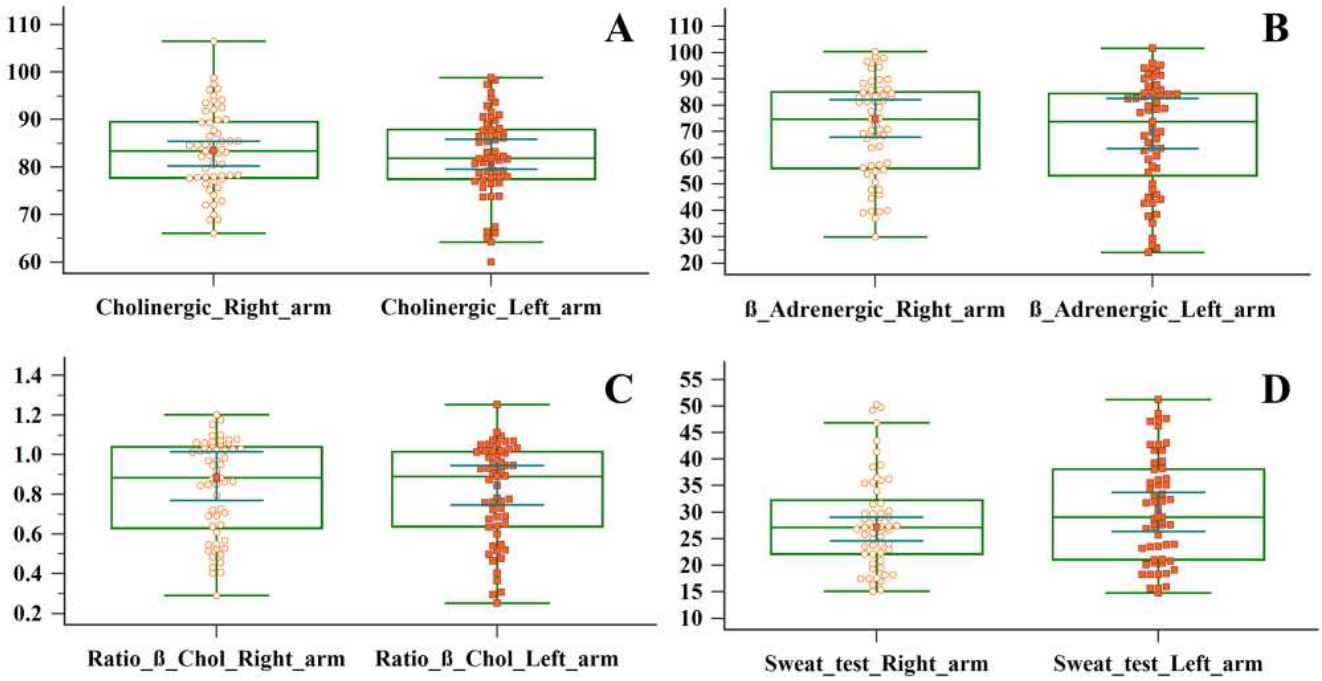


Figura 15. Associação entre braços (direito versus esquerdo) para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a [Cl-] obtida no teste do suor. A. Associação entre o pico do estímulo colinérgico na indução da sudorese entre o braço direito e esquerdo. (N = 57). (Braço direito) Mediana de 83,36; intervalo de confiança de 95% para a mediana (95%CI) = 80.247 a 85.464; (Braço esquerdo) Mediana de 81,82; 95%CI = 79,572 a 85,424. P-Value = 0,525. B. Associação entre o pico do estímulo β-adrenérgico na indução da sudorese entre o braço direito e esquerdo. (N = 57). (Braço direito) Mediana de 74,70; 95%CI = 67,843 a 82,155; (Braço esquerdo) Mediana de 73,74; 95%CI = 63,485 a 82,542. P-Value = 0,1204. C. Associação entre a razão β-adrenérgico/colinérgico na indução da sudorese entre o braço direito e esquerdo. (N = 57). (Braço direito) Mediana de 0.884; 95%CI = 0,769 a 1,014; (Braço esquerdo) Mediana de 0.889; 95%CI = 0,747 a 0,946. P-Value = 0,039. D. Associação entre [Cl-] no teste do suor entre o braço direito e esquerdo. (N = 57). (Braço direito) Mediana de 27,09; 95%CI = 24,592 a 29,070; (Braço esquerdo) Mediana de 29,070; 95%CI = 26,383 a 33,731. P-Value = 0,0316. Análise estatística realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de amostras relacionadas. Alpha = 0,05. Os dados, nessas figuras, estão apresentados pela mediana, 95%CI e boxplot. Além disso, cada dado obtido está marcado como um plot no gráfico.

Na correlação de Spearman (Rho) entre os dados obtidos em ambos os braços, houve correlação positiva do: (i) pico do estímulo colinérgico (Rho = 0,618); (ii) pico do estímulo β-adrenérgico (Rho = 0,861); (iii) razão β-adrenérgico/colinérgico (Rho = 0,824); (iv) [Cl^-] no teste do suor (Rho = 0,757) (Figura 16 A, B, C, D).

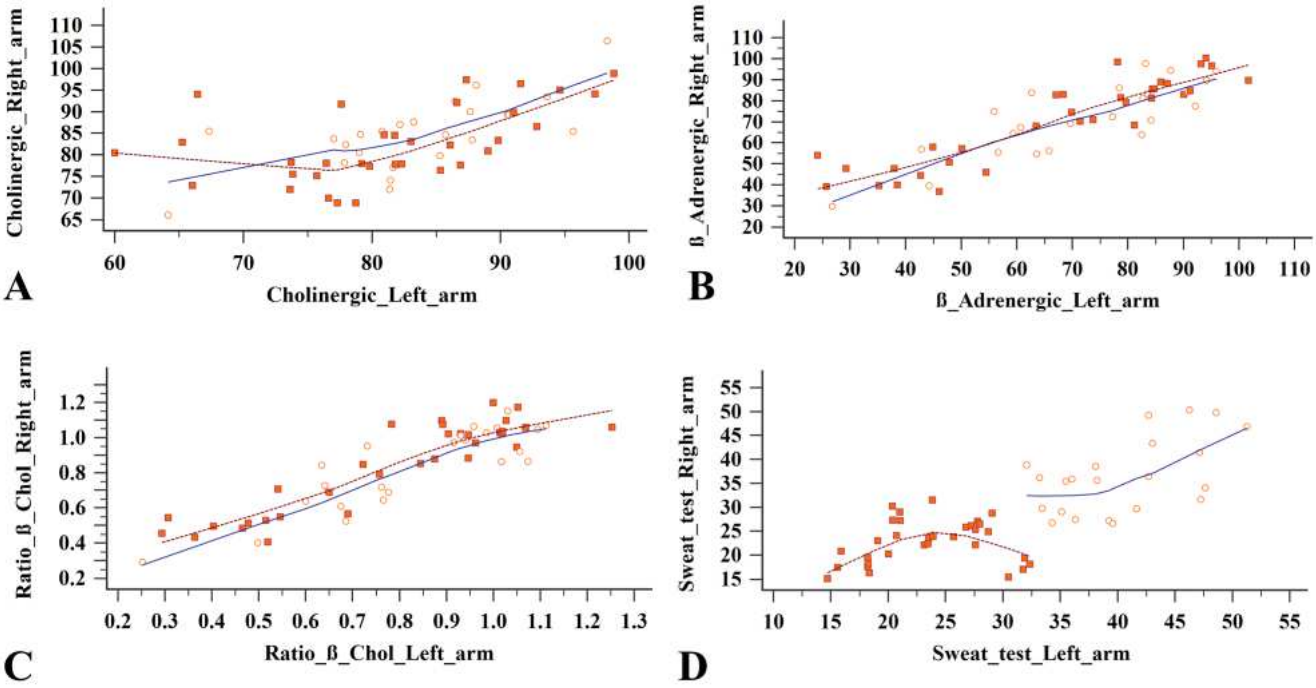
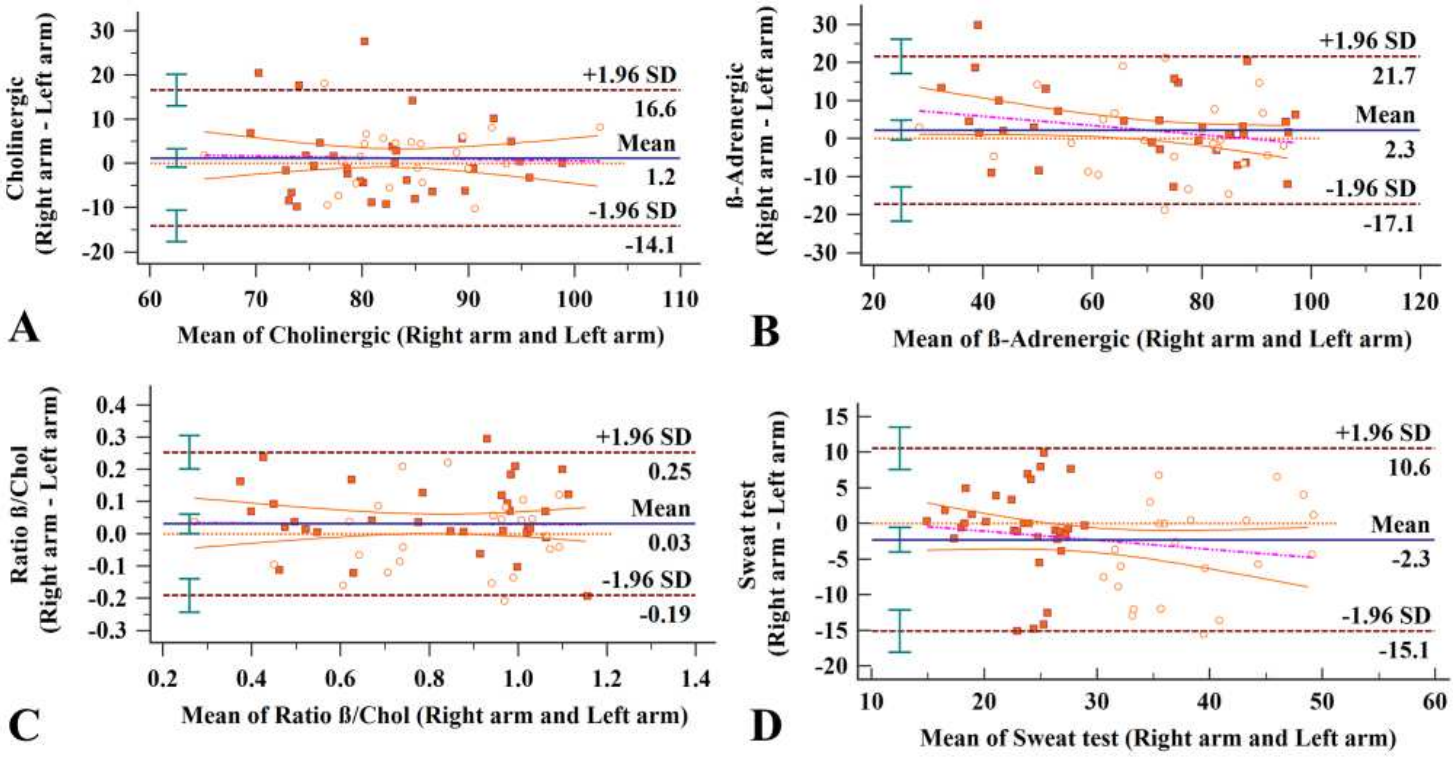


Figura 16. Correlação de Spearman (Rho) entre os dados obtidos em ambos os braços (direito versus esquerdo), para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a [Cl-] obtida no teste do suor. A. Pico do estímulo colinérgico [Rho = 0,618; intervalo de confiança de 95% do Rho (95%CI) = 0,426 a 0,757]. P-Value < 0,001. (N = 57). B. Pico do estímulo β-adrenérgico (Rho = 0,861; 95%CI = 0,774 a 0,916). P-Value < 0,001. (N = 57). C. Razão β-adrenérgico/colinérgico (Rho = 0,824; 95%CI = 0,718 a 0,893). P-Value < 0,001. (N = 57). D. [Cl-] no teste do suor (Rho = 0,757; 95%CI = 0,618 a 0,850). P-Value < 0,001. (N = 57). O quadrado vermelho representa os resultados do teste do suor com valor da [Cl-] inferior a 30 mEq/L (resultado normal) e o círculo vermelho representa o valor na [Cl-] ≥ 30 mEq/L a 60 mEqL (resultado borderline). No gráfico, além da descrição dos dados pelo resultado do teste do suor, está apresentado a linha de tendência pela LOWESS (Locally Weighted Scatterplot Smoothing) com um alcance de 80%. A análise estatística foi realizada pela correlação por postos de Spearman. Alpha = 0,05.

Concomitantemente, foi analisada a concordância e presença de diferença dos valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e teste do suor, entre os braços. Houve concordância e ausência de



diferença para o pico do estímulo colinérgico e pico do estímulo β-adrenérgico, porém a razão β-adrenérgico/colinérgico e [Cl^-] entre os braços foram discordantes, havendo presença de diferença entre as amostragens (média das diferenças não apresentou sobreposição a linha de equidade = 0) (Figura 17 A, B, C, D).

Figura 17. Bland-Altman plot entre os dados obtidos em ambos os braços (direito versus esquerdo), para os valores obtidos na indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e para a [Cl-] obtida no teste do suor. A. Pico do estímulo colinérgico (N = 57). Média aritmética = 1,234; intervalo de confiança de 95% (95%CI) da média (-0,848 a 3,316). P-Value = 0,240. Limite inferior = -14,147 (95%CI = -17,727 a -10,568) e limite superior = 16,615 (95%CI = 13,036 a 20,194). y = 4,1619 + (-) 0,03532x. B. Pico do estímulo β-adrenérgico (N = 57). Média aritmética = 2,295 (95%CI = -0,335 a 4,925). P-Value = 0,086. Limite inferior = -17,131 (95%CI = -21,652 a -12,610) e limite superior = 21,721 (95%CI = 17,200 a 26,242). Y = 10,764 + (-) 0,1210x. C. Razão β-adrenérgico/colinérgico (N = 57). Média aritmética = 0,031 (95%CI = 0,001 a 0,061). P-Value = 0,043. Limite inferior = -0,191 (95%CI = -0,243 a -0,140) e limite superior = 0,254 (95%CI = 0,202 a 0,305). Y = 0,03549 + (-) 0,005285x. D. [Cl-] no teste do suor. (N = 57). Média aritmética = -2,263 (95%CI = -3,998 a -0,527). P-Value = 0,012. Limite inferior = -15,082 (95%CI = -18,065 a -12,099) e limite superior = 10,556 (95%CI = 7,573 a 13,539). Y = 1,4811 + (-) 0,1277x. O quadrado vermelho representa os resultados do teste do suor com valor da [Cl-] inferior a 30 mEq/L (resultado normal) e o círculo vermelho representa o valor na [Cl-] ≥ 30 mEq/L a 60 mEqL (resultado borderline). Alpha = 0,05. No gráfico está apresento: (i) linha de equidade; (ii) 95%CI para a média da diferença; (iii) 95%CI para o limite de concordância; (iv) linha de regressão para as diferenças (viés) e seu 95%CI.

Dado que contrasta com a moderada/forte concordância no coeficiente de correlação intraclasse (CC), sendo: (pico do estímulo colinérgico) CC = 0,588 (95%CI = 0,389 a 0,735); (pico do estímulo β-adrenérgico) CC = 0,877 (95%CI = 0,799 a 0,925); (razão β-adrenérgico/Colinérgico) CC = 0,891 (95%CI = 0,822 a 0,934); ($[Cl^-]$) CC = 0,760 (95%CI = 0,624 a 0,851).

Quanto ao sexo, o pico do estímulo β-adrenérgico (ambos os braços) e razão β-adrenérgico/colinérgico (ambos os braços) foram maiores no sexo masculino, do que no sexo feminino (Tabela 5 – incluindo os percentis para os dados avaliados).

Marcador	Sexo	Mínimo	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 75	Máximo	p-value
Pico β-adrenérgico – braço direito	Masculino	39,73	67,90	**81,75**	86,94	100,33	**0,021**
	Feminino	29,84	50,97	**67,75**	82,20	98,50	
Pico β-adrenérgico – braço esquerdo	Masculino	35,15	68,70	**84,17**	90,90	101,70	**< 0,001**
	Feminino	24,10	43,47	**63,03**	78,42	95,06	
Razão β-adrenérgico/Colinérgico – braço direito	Masculino	0,486	0,717	**1,013**	1,055	1,174	**0,038**
	Feminino	0,291	0,527	**0,821**	0,997	1,201	
Razão β-adrenérgico/Colinérgico – braço esquerdo	Masculino	0,403	0,764	**0,985**	1,035	1,112	**0,004**
	Feminino	0,252	0,517	**0,726**	0,922	1,253	

Tabela 5. Associação do sexo dos participantes com os valores do estímulo β-adrenérgico de acordo com o braço avaliado*. N, número de participantes. Análise estatística realizada pelo teste U de Mann-Whitney de amostras independentes. Dados apresentados pela mediana (percentil 25th e percentil 75th). Alpha = 0,05. *

4.3. Correlação entre a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a $[Cl^-]$ no teste do suor

Nenhuma correlação entre os valores do pico do estímulo β-adrenérgico e razão β-adrenérgico/colinérgico com a [Cl^-] no teste do suor foi significante (independentemente do braço considerado e a média entre braços) (Figura 18).

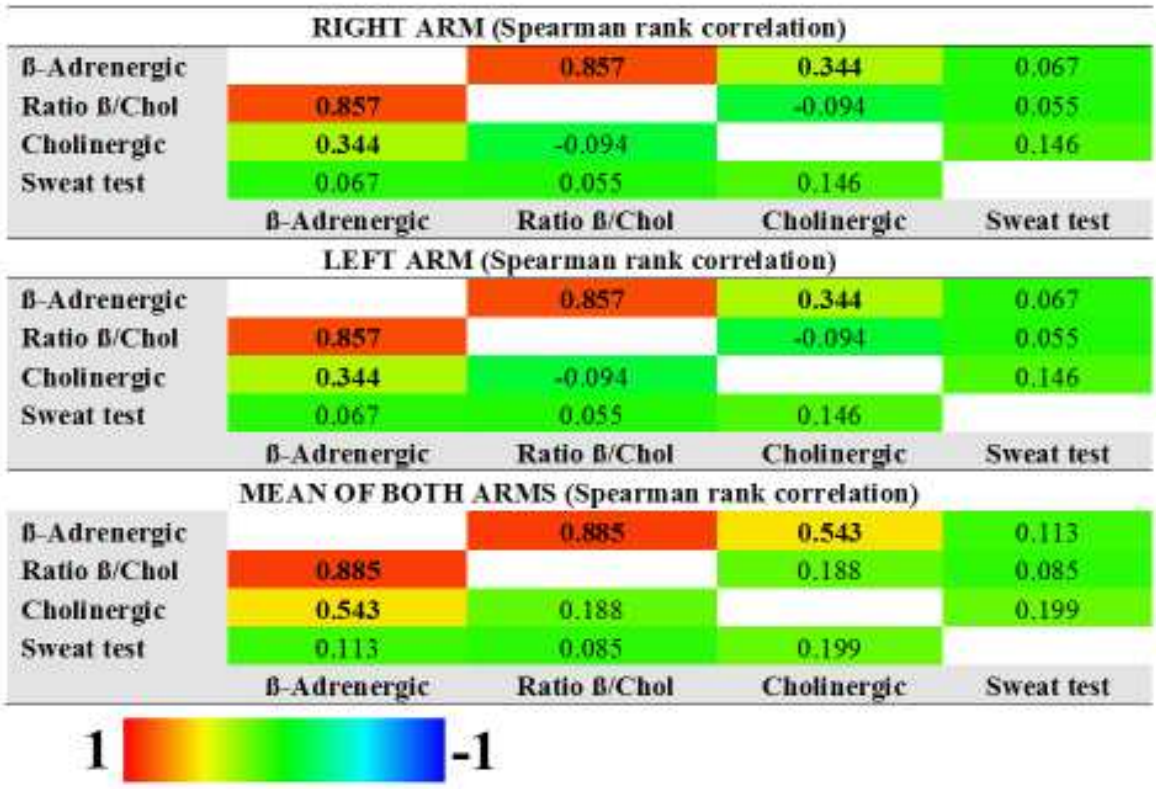


Figura 18. Correlação de Spearman entre os valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, Razão β-adrenérgico/colinérgico e [Cl-] no teste do suor. Correlação com p-value significativo (< 0,05) estão apresentados em negrito. Alpha = 0,05.

Nas Tabela 6 e 7 são listadas a descrição exploratória de nossos achados do estímulo β-adrenérgico e razão β-adrenérgico/colinérgico considerando os pontos de corte de normalidade descritos na literatura para indivíduos controles sem mutações do *CFTR* ou com apenas uma variante patogênica no gene *CFTR* (heterozigoto). Nenhum dos marcadores – pico do estímulo β-adrenérgico e razão β-adrenérgico/colinérgico – foi diferente entre os grupos descritos para o teste do suor de acordo com [Cl^-] em mEq/L: < 30 ou ≥ 30 a < 60 (p-value > 0,05).

Estímulo β-adrenérgico e razão entre o pico do estímulo β-adrenérgico e pico de estímulo colinérgico			
Estímulo β-adrenérgico	**Ponte de corte**	**Braço esquerdo (N)**	**Braço direito (N)**
Masculino	≤ 36	1	0
	36 a 51*	3	4
	52 a 62**	2	2
	≥ 62	23	23
Feminino	11 a 20*	0	0
	≥ 20 a 35	4	1
	≥ 35 a 46**	5	4
	≥ 46	19	23
Razão β-adrenérgico/Colinérgico	**Ponte de corte**	**Braço esquerdo (N)**	**Braço direito (N)**
Masculino	≤ 0,5	2	2
	0,5 a 0,7*	4	4
	≥ 0,7 a 0,9**	5	5
	≥ 0,9	18	18
Feminino	≤ 3	2	1
	3 a 0,4*	2	0
	≥ 0,4 a 0,7	9	11
	≥ 0,7 a 0,9**	6	6
	≥ 0,9	9	10

Tabela 6 Estímulo β-adrenérgico e razão entre o pico do estímulo β-adrenérgico e pico de estímulo colinérgico considerando os pontos de corte de normalidade descritos na literatura para indivíduos controles sem mutações do *CFTR* ou com apenas uma variante patogênica no gene *CFTR* (heterozigoto). **, padrão considerado como heterozigoto, *padrão considerado como ausência de mutações no gene *CFTR*. N, número de participantes; *CFTR*, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

Sexo	Estudo	β-adrenérgico	β-adrenérgico/Colinérgico
Masculino	Quinton et al. (2012) (34)	57 (52 a 62)	0,80 (0,7 a 0,9)
	Unicamp (29)	76,85 (70,32 a 83,37)	0,897 (0,821 a 0,973)
Feminino	Quinton et al. (2012) (19)	40 (35 a 46)	0,80 (0,7 a 0,9)
	Unicamp (28)	62,86 (55,44 a 70,28)	0,742 (0,646 a 0,839)

Tabela 7. Comparação descritiva entre os valores de referência para o estímulo β-adrenérgico da glândula sudorípara entre os nossos valores e os de referência obtidos em: 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):732-739.

4.4. Correlação da temperatura e umidade do laboratório com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor

Não houve correlação da temperatura e umidade do ambiente com a razão β-adrenérgico/colinérgico. No entanto, foi observada moderada correlação da umidade com o valor do pico colinérgico (braço direito, Rho = -0,425; braço esquerdo, Rho = -0,487) e leve da temperatura com a [Cl^-] no teste do suor (braço direito, Rho = -0,216; braço esquerdo, Rho = -0,250) (p-value < 0,05) (Figura 19). Os dados descritivos estão apresentados na legenda da Figura 19.

RIGHT ARM (Spearman rank correlation)

	ß-Adrenergic	Ratio ß/Chol	Sweat test	Temperature	Cholinergic	Moisture
ß-Adrenergic		0.857	0.067	0.012	**0.344**	-0.095
Ratio ß/Chol	**0.857**		0.055	0.079	-0.094	0.169
Sweat test	0.067	0.055		0.000	0.146	0.160
Temperature	0.012	0.079	0.000		-0.216	-0.170
Cholinergic	**0.344**	-0.094	0.146	**-0.216**		**0.425**
Moisture	-0.095	0.169	0.160	-0.170	**0.425**	

LEFT ARM (Spearman rank correlation)

	ß-Adrenergic	Ratio ß/Chol	Cholinergic	Sweat test	Temperature	Moisture
ß-Adrenergic		**0.911**	**0.638**	0.084	0.128	-0.139
Ratio ß/Chol	**0.911**		**0.345**	0.128	0.107	0.082
Cholinergic	**0.638**	**0.345**		0.103	0.136	**0.487**
Sweat test	0.084	0.128	0.103		**0.250**	-0.110
Temperature	0.128	0.107	0.136	**0.250**		-0.171
Moisture	-0.139	0.082	**-0.487**	-0.110	-0.171	

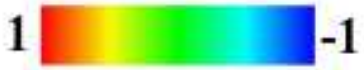


Figura 19. Correlação de Spearman dos valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão **β-adrenérgico/colinérgico e** [Cl^-] **no teste do suor com a umidade do ambiente e temperatura do ambiente durante a realização dos testes. Correlação com p-value significativo (< 0,05) estão apresentados em negrito. Alpha = 0,05. Na comparação entre momentos de análise a temperatura foi maior quando o exame foi realizado no braço esquerdo, e a umidade foi menor. Temperatura: (braço esquerdo) 27,79 (26,65 a 28,82);**

(braço direito) 26,50 (23 a 28,33). Umidade: (braço esquerdo) 42,80 (37,33 a 50,24); (braço direito) 49 (43,23 a 55,12). Análise realizada pelo teste dos postos sinalizados de Wilcoxon de amostras relacionadas

4.5. Associação dos marcadores clínicos, demográficos e laboratoriais com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a [Cl^-] no teste do suor

No estudo, as seguintes variáveis não apresentaram associação com a indução da secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a [Cl^-] no teste do suor: (i) etnia (caucasoide versus outros); (ii) idade agrupado (≤ 25 anos; 26 a 40 anos; ≥ 41 anos); (iii) braço dominante (direito ou esquerdo); (iii) atividade física (ativo ou sedentário). No entanto, houve associação significativa com (Figura 20 e Tabela 8):(i) idade e [Cl^-] no teste do suor [(braço direito) Rho = -0,330; (braço esquerdo) Rho = -0,275)];(ii) peso com o pico do estímulo β-adrenérgico [(braço direito) Rho = 0,243; (braço esquerdo) Rho = 0,403)]; razão β-adrenérgico/colinérgico [(braço direito) Rho = 0,210; (braço esquerdo) Rho = 0,297); pico do estímulo colinérgico [(braço esquerdo) Rho = 0,376)];(iii) altura com o pico do estímulo β-adrenérgico [(braço direito) Rho = 0,307; (braço esquerdo) Rho = 0,411)]; razão β-adrenérgico/colinérgico [(braço direito) Rho = 0,257; (braço esquerdo) Rho = 0,388); pico do estímulo colinérgico [(braço esquerdo) Rho = 0,227]; [Cl^-] no teste do suor [(braço esquerdo) Rho = 0,227)];(iv) IMC com pico do estímulo β-adrenérgico [(braço esquerdo) Rho = 0,263)]; pico do estímulo colinérgico [(braço esquerdo) Rho = 0,341];(v) IMC (kg/m^2) agrupado em magreza (< 18,5) + eutrofia (18,5 ≥ a 25) versus sobrepeso (≥ 25 a 30) versus obesidade (≥ 30) com pico do estímulo β-adrenérgico (ambos os braços); pico do estímulo colinérgico (ambos os braços); (vi) menstruação com pico do estímulo β-adrenérgico (braço esquerdo); razão β-adrenérgico/colinérgico (braço esquerdo).

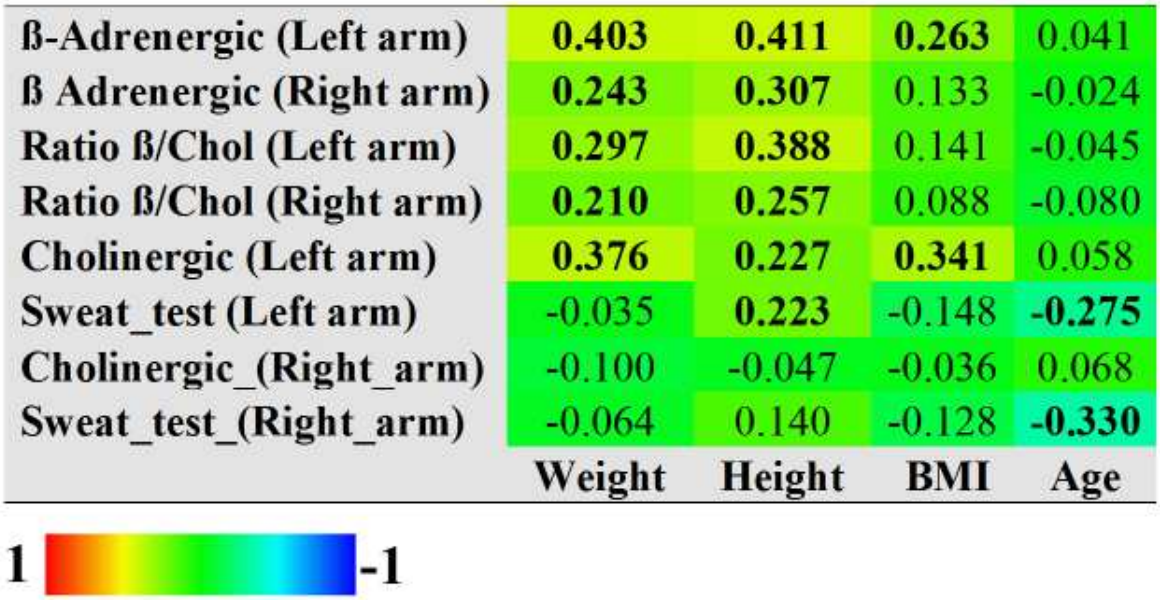


Figura 20. Correlação de Spearman dos valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão **β-adrenérgico/colinérgico e concentração do íon do cloreto no teste do suor com a idade, altura, peso e índice de massa corpórea dos participantes. Correlação com p-value significativo (< 0,05) estão apresentados em negrito. Alpha = 0,05.**

Marcador	Braço direito			p-value	Braço esquerdo			p-value
	Baixo peso + eutrofia (N = 23)	Sobrepeso (N = 22)	Obesidade (N = 12)		Baixo peso + eutrofia (N = 23)	Sobrepeso (N = 22)	Obesidade (N = 12)	
β-adrenérgico	81,41 (57,52 a 85,31)	64,15 (44,67 a 81,22)	83,74 (73,06 a 91,18)	0,027*	71,37 (56,09 a 84,16)	64,62 (42,77 a 83,47)	85,12 (73,99 a 91,67)	**0,045***
Colinérgico	84,80 (78,71 a 92,09)	78,07 (74,09 a 83,72)	86,01 (83,42 a 90,95)	0,016**	81,82 (77,86 a 87,15)	79,49 (75,69 a 82,30)	90,18 (86,65 a 92,19)	**0,043****
					Menstruada (N = 4)	**Pré ou pós menstruação (N = 21)**	**Menopausa (N = 3)**	**p-value**
β-adrenérgico					62,04 (58,63 a 73,30)	67,04 (45,54 a 78,94)	26,77 (24,77 a 38,67)	**0,045*****
β-adrenérgico/colinérgico					0,716 (0,657 a 0,857)	0,783 (0,579 a 0,934)	0,307 (0,266 a 1,035)	**0,037*****

Tabela 8. Associação do status do IMC e da menstruação dos participantes. N, número de participantes. Análise estatística realizada pelo teste Kruskal-Wallis de amostras independentes. Dados apresentados pela mediana (percentil 25th e percentil 75th). Alpha = 0,05. *, sobrepeso e obesidade são diferentes entre si; **, sobrepeso é diferente dos demais grupos; *, obesidade é diferente dos demais grupos; ****, menopausa é diferente do grupo pré ou pós menstruação. Todas as mulheres menstruadas ou do grupo menopausa tinham braço direito como dominante, e dentre as pré ou pós menstruação, 4 tinham braço dominante esquerdo. Associação do status do [índice de massa corpórea e da menstruação dos participantes com os valores do estímulo β-adrenérgico de acordo com o braço avaliado.**

4.6. Associação da espirometria (litros) com a secreção do suor por estímulo β-adrenérgico e a concentração do íon cloreto no teste do suor

Na avaliação da espirometria houve correlação positiva (leve/moderada) entre os marcadores, principalmente, CVF (L), VEF_1 (L) e VEF_1/CVF (L) com pico do estímulo β-adrenérgico e razão β-adrenérgico/colinérgico e do $FEF_{25-75\%}$ (L) com a [Cl^-] no teste do suor (Figura 21). Por se tratar de uma amostra de participantes saudáveis a interpretação dos achados foi baseada no valor em litros da espirometria.

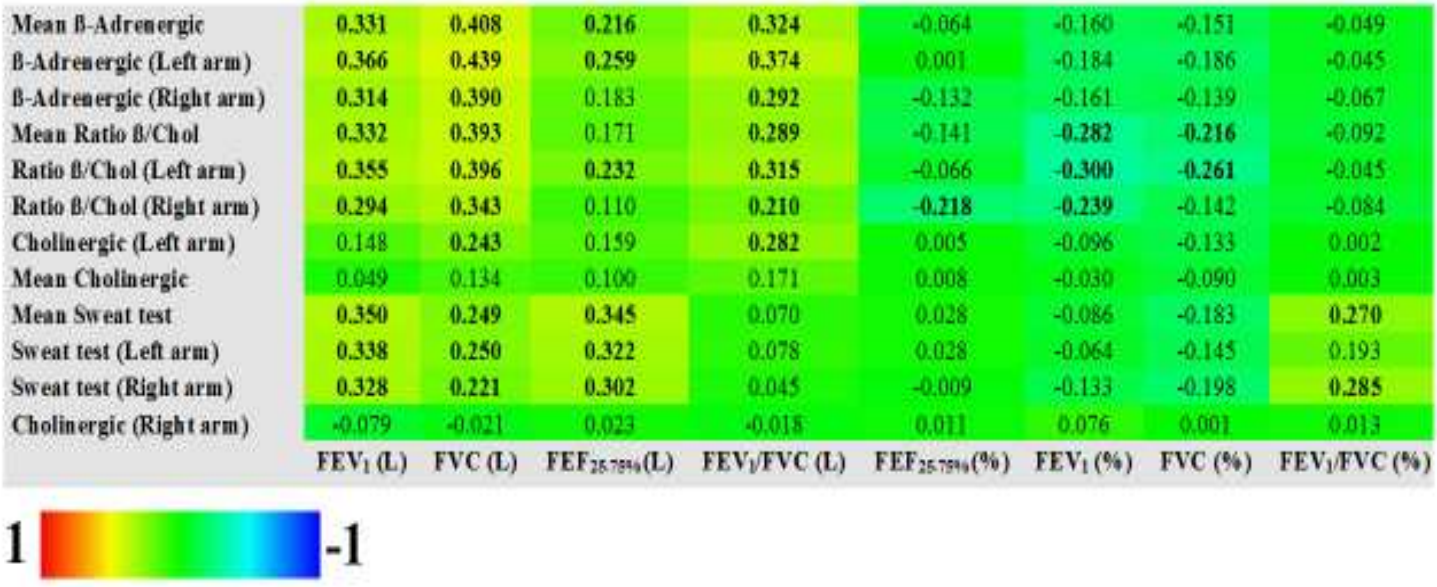


Figura 21. Correlação de Spearman entre os valores do pico do estímulo colinérgico, pico do estímulo β-adrenérgico, razão β-adrenérgico/colinérgico e os marcadores da prova de função pulmonar dos participantes do estudo. Correlação com p-value significativo (< 0,05) estão apresentados em negrito. Alpha = 0,05. FEV1, volume expiratório forçado no primeiro segundo da capacidade da vital forçada; FVC, capacidade vital forçada; FEF25-75%, fluxo expiratório forçado entre 25% e 75% da capacidade vital forçada; L, litros; %, porcentagem do predito.

Na avaliação da espirometria todos os valores estavam dentro do limite de normalidade, exceto um participante que apresentou o VEF_1(%) de 73, porém com CVF (%) de 84, VEF_1/CVF de 86 e $FEF_{25-75\%}$ de 57 (ANEXO VIII)

4.7. Descrição da dor e qualidade da bolha

A avaliação do questionamento de dor está apresentada na Tabela 9. Na avaliação geral do teste, 9/57 dos participantes relataram ausência de dor, 29/57 (50,9%) dor leve e 19/57 (33,3%) dor moderada. Nenhum participante classificou a dor na intensidade de 8 a 10. Na avaliação do conforto, de acordo com o braço, 34/57 (59,6%) dos participantes relataram que o teste no braço direito era mais

desconfortável, 13/57 (22,8%) no esquerdo e 10/57 (17,5%) indiferente. Em relação a posição de realização do procedimento, 55/57 (96,5%) dos participantes descreveram a posição como confortável. Na Tabela 7 está descrita a qualidade da bolha do teste, de acordo com o braço.

Escala visual analógica					
Braço D	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	4ª Injeção	Total
Leve	28(49,1%)	30(52,6%)	19(33,3%)	43(75,4%)	120(52,64%
Moderada	21(36,8%)	21(36,8%)	30(52,6%)	13(22,8%)	85 (37,28%
Intensa	8 (14%)	6 (10,5%)	8 (14%)	1 (1,8%)	23 (10,08%
Braço E	1ª Injeção	2ª Injeção	3ª Injeção	4ª Injeção	Total
Leve	28(49,1%)	28(49,1%)	22(38,6%)	43(75,4%)	121(53,08%
Moderada	22(38,6%)	26(45,6%)	32(56,1%)	12(21,1%)	92 (40,35%
Intensa	7 (12,3%)	3 (5,3%)	3 (5,3%)	2 (3,5%)	15 (6,57%)
Braço D	1ª Bolha	2ª Bolha	3ª Bolha	4ª Bolha	Total
Ausente	1(1,8%)	0	0	0	1 (0,44%)
Ruim	1(1,8%)	1 (1,8%)	0	0	2 (0,88%)
Média	9(15,8%)	8 (14%)	2 (3,5%)	2 (3,5%)	21 (9,22%)
Boa	42(73,7%)	43 75,4%)	47(82,5%)	49 (86%)	181(79,38%
Ótima	4 (7%)	5 (8,8%)	8(14%)	6 (10,5%)	23(10,08%)
Braço E	1ª Bolha	2ª Bolha	3ª Bolha	4ª Bolha	Total
Ausente	1 (1,8%)	0	0	0	1 (0,44%)
Ruim	4 (7%)	2 (3,5%)	1 (1,8%)	0	7 (3,07%)
Média	9 (15,8%)	4 (7%)	2 (3,5%)	5 (8,8%)	20 (8,77%
Boa	41(71,9%)	50(87,7%)	54(94,7%)	48(84,2%)	193(84,65%
Ótima	2 (3,5%)	1 (1,8%)	0	4 (7%)	7 (3,07%)

Tabela 9. Escala visual analógica para dor e qualidade da bolha após cada injeção no de acordo com o braço.

4.8. Descrição da Duração do Teste

Sobre o tempo de duração total de todos os testes, que tiveram uma duração de 120 min a 150 min, 39 (68,4%) dos participantes não consideraram os procedimentos demorados (entrevista, espirometria, evaporimetria nos dois braços, teste do suor clássico nos dois braços e coleta de sangue). Já 18 (31,6%)

participantes consideram os procedimentos demorados. A evaporimetria não foi avaliada de forma isolada. Cada teste de evaporimetria durou em média 30-40 minutos.

4.9 Resultados dos Participantes Excluídos

Os 3 participantes excluídos obtiveram resultados do teste de suor e evaporimetria alterados. As duas mulheres tiveram sequenciamento genético alterados e o homem material insuficiente para análise (Tabela 10). As duas participantes do sexo feminino com mutações, uma heterozigota para a mutação F1052V (mutação de classe IV) e a outra com mutação F508del (mutação de classe 2) / L997F domínio 8 transmembrana, de significado incerto.

Na amostra de sangue do sujeito do sexo masculino com teste de suor e evaporimetria alterado encaminhado para o sequenciamento genético, o DNA extraído não foi suficiente para análise.

SUJEITO	SEXO	TS – BD	TS-BE	RAZÃO B-COCK_CCH BD (MÉDIA)	RAZÃO B-COCK_CCH BE (MÉDIA)	GENÉTICA (MUTAÇÃO)
1	M	57,33	61,4	0,419	0,585	DNA extraído insuficiente para análise.
2	F	74,38	78,52	0,169	0,129	Heterozigota para a mutação F1052V (classe IV)
3	F	58,27	63,00	0,034	0,144	Mutação F508del (classe II) / L997F

Tabela 10. Dados dos pacientes que foram excluídos por apresentarem TS alterado e evaporimetria. Foram detectadas em dois pacientes mutações na CFTR.

5. Discussão

Por se tratar de uma doença crônica, de caráter progressivo, sem a possibilidade ainda de uma terapêutica que promova a cura (Collie et al., 2014), com a necessidade de encaminhamento dos pacientes diagnosticados para centros de referência para tratamento e uso de medicamentos de alto custo (Ribeiro et al, 2002), o diagnóstico seguro e preciso se torna fundamental para a orientação e condução adequada dos casos pela equipe médica e melhor prognóstico dos pacientes.

No estudo, encontramos valores da razão β-adrenérgico/Colinérgico diferentes do que os da literatura e os valores foram diferentes entre os sexos, sendo maiores no sexo masculino, concordante com estudos publicados. Além disso, chama a atenção que apesar da presença de correlação positiva e significante entre os valores dos testes entre os braços D e E, houve ausência de concordância para razão β-adrenérgico/Colinérgico e a [Cl^-]. Porém apesar de ser estatisticamente diferente, essa diferença é pequena e sem relevância clínica. Os picos β-adrenérgico e a razão β-adrenérgico/Colinérgico não apresentaram correlação com a [Cl^-] por se tratar de uma amostra de indivíduos sem mutação no *CFTR*. Na análise da variabilidade do resultado do estímulo β-adrenérgico foi observada a influência da umidade, variáveis antropométricas e sexo e, no teste do suor, da temperatura do ambiente e da idade do participante, sendo a [Cl^-] maior, quanto menor a idade. Adicionalmente, houve menor valor da razão β-adrenérgico/Colinérgico em participantes na menopausa, com uma possível associação com a idade e baixos níveis hormonais, ambas características inatas do envelhecimento. Na avaliação da função pulmonar houve correlações fracas e moderadas, principalmente com o pico do estímulo β-adrenérgico e razão β-adrenérgico/Colinérgico, mesmo na ausência de doença pulmonar e de mutações do CFTR. O teste para avaliação do estudo da secreção de suor por estímulo β-adrenérgico da glândula sudorípara foi tolerado e a dor referida como de leve intensidade na maioria dos testes.

Até o momento, como evidenciado na literatura, pacientes com FC não apresentaram sudorese após o estímulo com beta-coquetel tendo o valor da razão β-adrenérgico/Colinérgico próximo a zero por cento; participantes com

uma variante patogênica no CFTR apresentaram ~50% da média de sudorese da razão β-adrenérgico/Colinérgico; e participantes sem variante patogênica no CFTR tiveram uma curva de sudorese mediante ao estímulo β-adrenérgico semelhante à da fase colinérgica (Gonska T, 2009). No entanto, participantes com doenças relacionadas apresentaram sudorese abaixo da média de 50%, mas acima de 0%, diferenciando-os dos pacientes com FC (Quinton P, 2012).

De maneira geral, na medida em que a visão da FC como um espectro de doenças evolui, a determinação do diagnóstico preciso, e de seu amplo fenótipo, se torna desafiadora, porém fundamental. Dentro desse âmbito, é importante estabelecer critérios para excluir ou confirmar o diagnóstico de FC ou CFTR-RD.

Com o intuito de fornecer um novo aparato de ferramentas para o diagnóstico e entendimento da FC e sua expressão, os testes bioelétricos, somados ao teste do suor, ganharam destaque, por fornecerem o suporte na avaliação da função da CFTR. No entanto, as ferramentas de avaliação bioelétricas, ainda apresentam limitações e carecessem de subsídios para sua correta interpretação, não sendo ainda disponibilizadas como ferramentas para diagnóstico definitivo e avaliação de comprometimento tecido-específico (Quinton P, 2012; Ooi CY, 2014; Behm JK, 1987). Os estudos de eletrofisiologia, dentre eles a avaliação bioelétrica da CFTR, e sua variabilidade sofrem influência de numerosos fatores, o que inclui: (i) variáveis ambientais e genéticas (genes modificadores e classes de mutações de CFTR); (ii) do examinador; (iii) inatas do sujeito avaliado (sexo, idade, IMC, altura, etnia e dentro outros); (iv) tipo de protocolo aplicado.

A indução da CFTR na glândula sudorípara por estímulo β-adrenérgico foi validada como um teste *in vivo* para medir a função da CFTR (Quinton P, 2012), e tem sido considerado um teste sensível para quantificar, graduar e estratificar a função da CFTR. Dessa forma, no futuro, poderá auxiliar no diagnóstico da FC e doenças relacionadas. O teste é de fácil execução, porém requer treinamento e entendimento/disponibilidade da técnica de eletrofisiologia para avaliar/reduzir a variabilidade nos resultados inerentes ao examinador, clima, etnia, interação medicamentosa, dentre outras. O resultado do teste é obtido *in loco* e, dessa forma, ajustes e/ou repetições podem ser realizados sem necessidade de

esperar alguns dias. No estudo, o programa desenvolvido para laudo facilitou e agilizou a interpretação dos achados.

Não houve a necessidade de repetir nenhum exame por erro, inconsistência ou mau funcionamento do aparelho. Além disso, a indução da CFTR na glândula sudorípara por estímulo β-adrenérgico foi estabelecida em alguns centros do mundo, mas ainda é muito pouco utilizada. No hemisfério sul, incluindo todos os países de clima tropical, nosso centro é o único que realiza o estudo da secreção do suor pelo estímulo β-adrenérgico.

Outro fato que merece destaque, é que todos participantes apresentaram sudorese após estímulo β-adrenérgico, e dessa forma, a função da CFTR esteve presente em todos os sujeitos. Chama a atenção que dentro da amostra um elevado número de sujeitos apresentou teste do suor *boderline*. No protocolo do estudo, o teste do suor foi realizado após o teste da indução do suor por estímulo β-adrenérgico, e dessa forma, pode ter ocorrido interferência nos resultados obtidos, o que explicaria o maior número do que o esperado de sujeitos com [Cl^-] entre 30 e 60 mEq/L.

Como esse é um primeiro estudo e ainda não há evidência da interferência das drogas utilizadas e seu tempo de atuação, na indução da sudorese e, concomitantemente estimulação da CFTR, pode ter ocorrido influência sobre o resultado do segundo teste realizado no mesmo dia (teste do suor). A interpretação desses dados deve ser feita com cautela e novos estudos deverão ser realizados para verificação. Mediante esse achado, sugerimos a realização dos testes em dias ou braços diferentes.

Em relação aos dados antropométricos, como em estudo anterior (Quinton P, 2012), as taxas de secreção de suor por estímulo β-adrenérgico, em saudáveis, sem variante patogênica no gene CFTR, foram estatisticamente diferentes entre os sexos, sendo maiores no sexo masculino, o que pode ser explicado pela diferença na constituição corporal (Behm JK, 1987). No sexo masculino ocorre, quantitativamente, um menor número de glândulas sudoríparas ativas, porém com maior taxa de secreção de suor (Sato K, Sato F, 1988).

Com os dados, foi possível determinar a razão de valores para ambos os sexos, que podem ser utilizados como primeiro passo para buscar a referência para a população brasileira. Um dado de destaque desse estudo é que ao analisar os valores dos saudáveis na literatura, as médias da razão β-adrenérgico/Colinérgico têm uma tendência a serem mais elevadas. Uma explicação plausível pode ser pelo clima tropical que é associado a uma maior taxa de transpiração.

Os participantes com valor reduzido da razão β-adrenérgico/Colinérgico e/ou valor limítrofe no teste do suor, semelhante à resposta de um indivíduo heterozigoto para variante patogênica no CFTR, tiveram o sequenciamento do CFTR realizado e não foi observada variantes patogênicas. Uma explicação seria que outros canais estejam agindo como moduladores da [Cl^-], e que mesmo o padrão ouro ao diagnóstico, está sujeito a interpretação individual do seu achado ou que exista resposta residual ao estímulo β-adrenérgico prévio ao teste do suor. Dessa forma, ressalta-se que os testes de eletrofisiologia têm elevada variabilidade e devem ser avaliados como parte de todo, e preferencialmente em associação.

A variabilidade observada dificulta a interpretação e comparação de um teste isolado de maneira universal entre diferentes grupos de pesquisa, e favorece a criação de uma uniformização de protocolos/curva de referência que seja população-específica. Além disso, mediante a variabilidade específica de cada teste, em alguns casos tido como duvidosos, a associação de mais de um teste se torna necessária para fornecer o diagnóstico confiável ao paciente.

No espectro fenotípico da FC, o único consenso comum é a interpretação da classificação de mutações de CFTR. Dentro dessa conjectura, idealmente se deve realizar curvas mundiais, que expressem a função da CFTR através dos testes de eletrofisiologia tendo como suporte a intepretação genética do paciente que é universal. Finalmente, tem-se que a ausência de correlação entre as razões dos valores de estímulo β-adrenérgico e [Cl^-] no teste do suor, pode ser explicada pela inclusão de apenas indivíduos saudáveis.

Dos seis testes do suor alterados, somados as seis evaporimetrias alteradas, correspondentes aos 3 pacientes excluídos do estudo, posteriormente

comprovaram que dois sujeitos, apesar de se declararem saudáveis, sem quaisquer queixas clínicas, se mostraram portadores de mutações relacionadas a CFTR após o sequenciamento genético, ou seja, o TS associado a evaporimetria foram eficazes em levantar possíveis candidatos a um *screening* genético complementar. Um sujeito ainda está com o sequenciamento genético em execução.

5.1. Limitações

(i) tamanho da amostra;

(ii) estudo inclui participante de apenas uma cidade;

(iii) limitação para análise estatística, sendo está exploratória;

(iv) realização de ambos os testes para mensurar a função de CFTR em um dia.

6. Conclusão

O estímulo β-adrenérgico da glândula sudorípara apresentou comportamento diferente (valores mais elevados) ao de estudos publicados. Dessa forma, acreditamos que os achados devam ser tidos como referência para população brasileira, no caso da avaliação de saudáveis e na ausência de variantes patogênicas de *CFTR*. O valor do teste é dependente de numerosos aspectos e estes devem ser considerados na sua interpretação. Curiosamente, o teste foi indicativo da variabilidade da função pulmonar, mesmo em saudáveis, e por ser reprodutível, poderá ser implementado como nova ferramenta de diagnóstico e seu uso para avaliar a função da CFTR deve ser estimulado, principalmente, em ensaios clínicos N de 1.

No futuro, deve-se comparar o estímulo β-adrenérgico e a [Cl^-] no teste do suor na presença de FC, portadores de uma variante patogênica no *CFTR* e em controles saudáveis sem variante no *CFTR* para o desenvolvimento de uma curva de normalidade, avaliação de sensibilidade e especificidade, preferencialmente num estudo multicêntrico que possa refletir uma amostra mais fidedigna da população brasileira.

7. REFERÊNCIAS

1. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. J Intern Med. 2015;277(2):155-66.
2. Andersen, D. H. (1938). Cystic Fibrosis of the pancreas and its relations to celiac disease: A clinical and pathologic study. Am. J. Dis. Child., (56), 344–399.
3. Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., & Riordan, J. R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Cell, 68(4), 809–818.
4. Beauchamp, M., & Lands, L. (2005). Sweat-testing: a review of current technical requirements. Pediatr Pulmonol., 39, 507–11.
5. Behm JK, Hagiwara G, Lewiston NJ, Quinton PM, Wine JJ. Hyposecretion of betaadrenergically induced sweating in cystic fibrosis heterozygotes. Pediatr Res. 1987;22(3):271-6.
6. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. J Cyst Fibros 2011;10 S2:S86–102.
7. Bonadia LC, de Lima Marson FA, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease Gene. 2014 May 1;540(2):183-90
8. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. Curr Opin Pulm Med. 2003;9(6):498-503.
9. Byun, S. O. et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, New York, Feb. 2009 v. 385, n. 1, p. 174-175,.
10. Cabello, G.M.K., Roig, S.R.S., Fonseca, A., Carvalho, E.C.D., Fernandes, O. (2003). Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação delta F508. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial., (39)1, 15-20.
11. Collie, J.T., Massie, R.J., Jones, O.A., LeGrys, V.A., Greaves, R.F. (2014). Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol., 49(2), 106-17.
12. Crossley, J., Elliott, R., & Smith, P. (1979). Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. Lancet, 1(8114), 472–474.

13. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, et al. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. J Cyst Fibros 2011;10 S2:S53–66.
14. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM, et al. CFTR biomarkers: time for promotion to surrogate end-point. Eur Respir J 2013;41:203–16.
15. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L, The diagnosis of cystic fibrosis. Presse Med. 2017 Jun;46(6 Pt 2):e97-e108
16. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. Cystic fibrosis : terminology and diagnostic algorithms. Thorax 2006;61:627–635.
17. Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. Eur J Hum Genet. 2009;17(1):51-65
18. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. Thorax 2010;65:594–9.
19. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr. 2008;153(2):S4-S14.
20. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. J Pediatr. 2017 Feb;181S:S4-S15
21. Farrell, P., & Koscik, R. (1996). Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. Pediatrics, 97, 524–528.
22. Gibson L, Cooke R. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 1959;23:545–9.
23. 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;64:932–8.
24. Gonska T, Maria HKS, Avolio J, Ip W, Griffin K, Dupuis A, et al. Comparing β–adrenergic sweat secretion to rectal and nasal potential difference

measurements as adjunctive diagnostic test for Cystic fibrosis. E Resp J 2018;(submitted).

25. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, et al.CFTR [Cl] channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. Gastroenterology. 2004;127(4):1085-95.
26. Jensen MP, Karoly P, Braver S. The measurement of clinical pain intensity: a comparison of six methods. Pain 1986;27:117-126.
27. Keenan K, Avolio J, Rueckes-Nilges C, Tullis E, Gonska T, Naehrlich L. Nasal potential difference: Best or average result for CFTR function as diagnostic criteria for cystic fibrosis? J Cyst Fibros 2014;14(3):310-6.
28. Kim J, Farahmand M, Dunn C, Davies Z, Frisbee E, Milla C, Wine JJ. Evaporimeter and Bubble-Imaging Measures of Sweat Gland Secretion Rates. PLoS One. 2016 Oct 21;11(10):e0165254.
29. Knowles M, Gatzy J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. N Engl J Med. 1981;305(25):1489-95.
30. Kuhnl, A e Faucz, F Análise da variabilidade genética do éxon 10 do gene CFTR. 2005. Estud. Biolog., v.27, n.58, jan./mar
31. Landsteiner, K. Intestinal obstruction from thickened meconium. Zentralbl Allg Pathol, 1905, 16, 903–907.
32. Levy H, Farrell PM. New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis. J Pediatr. 2015;166(6):1337-41.
33. Lucarelli, M., Narzi, L., Pierandrei, S., Bruno, S.M., Stamato, A., D'avanzo, M., Strom, R. & Quattrucci, S. (2010) A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 12, 548-55.
34. Mall M, Greger R, Seydewitz H, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K. Detection of defective cholinergic Cl^- secretion in human rectal biopsies for the diagnosis of Cystic Fibrosis. J Clin Invest 1998;102:15–21.
35. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro M, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. J Bras Pneumol. 2013;39(3):306-16.
36. Mehta G, Macek M, Mehta A, Group ERW. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. J Cyst Fibros. 2010;9 Suppl 2:S5-S21.
37. Mendes, F., Doucet, L., Hinzpeter, A., Ferec, C., Lipecka, J., Fritsch, J., … Amaral, M. D. (2004). Immunohistochemistry of CFTR in native tissues and primary epithelial cell cultures. J.Cyst.Fibros., 3 Suppl 2:, 37–41

38. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J; ATS/ERS Task Force. Standardization of spirometry. Eur Respir J. 2005;26(2):319-338.
39. Mishra, A., Greaves, R., Massie, J. (2007). The Limitations of Sweat Electrolyte Reference Intervals for the Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Systematic Review. Clin Biochem Rev., 28(2), 60–76
40. Noone PG, Knowles MR. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. Respir Res. 2001;2(6):328-32.
41. Ooi CY, Dupuis A, Gonska T, Ellis L, Ni A, Jarvi K, et al. Does integration of various ion channel measurements improve diagnostic performance in cystic fibrosis? Ann Am Thorac Soc. 2014;11(4):562-70.
42. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet. 2009;373(9678):1891-904.
43. Pereira CA, Sato T, Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. J Bras Pneumol. 2007;33(4):397-406.
44. Quinton & Bijman, Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis N Engl J Med. 1983 ;308(20):1185-9.
45. Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, et al. beta-adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186(8):732-9.
46. Quinton PM, Both Ways at Once: Keeping Small Airways Clean. Physiology (Bethesda). 2017 Sep;32(5):380-390
47. Quinton PM, Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. Physiology (Bethesda). 2007 Jun;22:212-25
48. Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. [Controversies in cystic fibrosis--from pediatrician to specialist]. J Pediatr (Rio J). 2002;78 Suppl 2:S171-86.
49. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. N Engl J Med 2005;352:1992–2001.
50. Salinas, DB et al. Low Beta-Adrenergic Sweat Responses in Cystic Fibrosis and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Metabolic Syndrome Children. Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology. 2017; Vol 30, N.1,2-6.
51. Sato K, Sato F. Variable reduction in beta-adrenergic sweat secretion in cystic fibrosis heterozygotes. J Lab Clin Med. 1988;111(5):511-8.

52. Schüler, D., Sermet-Gaudelus, I., Wilschanski, M., Ballmann, M., Dechaux, M., Edelman, A.,Knowles, M.R. (2004). Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. J Cyst Fibros., 3 Suppl 2:151-5.
53. Servidoni, M. F., Sousa, M., Vinagre, A. M., Cardoso, S. R., Ribeiro, M. A., Meirelles, L. R., … Amaral, M. D. (2013). Rectal forceps biopsy procedure in cystic fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility. BMC Gastroenterology, 13(1), 91.
54. Servidoni, MF 2017 Thirty Years of Sweat Chloride Testing at One Referral Center. Frontiers in Pediatrics , v. 5, p. 1-15, 2017.
55. Shales O. A simple and accurate method for the determination for the chroride in biological fluids. In: Shales SS, editor. 1941.
56. Solomon GM, Liu B, Sermet-Gaudelus I, Fajac I, Wilschanski M, Vermeulen F, et al. A multiple reader scoring system for Nasal Potential Difference parameters. J Cyst Fibros. 2017;16(5):573-8.
57. Sosnay PR, White TB, Farrell PM, Ren CL, Derichs N, Howenstine MS, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis in Nonscreened Populations. J Pediatr. 2017;181S:S52-S7.e2.
58. Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felicio V, et al. Measurements of CFTR-mediated Cl^- secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for Cystic Fibrosis diagnosis and prognosis. PLoS One. 2012;7(10):e47708.
59. Taylor C, Baxter P, Hardcastle J, Hardcastle P. Absence of secretory response in jejunal biopsy samples from children with cystic fibrosis. Lancet 1987;II:107–108.

8. ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Instituição: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

- Avaliação da correlação entre a função da CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) resultante da estimulação β-adrenérgica das glândulas sudoríparas comparada a função da CFTR em biópsia retal *ex vivo.*

( ) Controles Maior de Idade

Eu_____
portador do RG_____telefone_____residente na rua_____bairro_____ cidade_____ Estado_____ por livre e espontânea vontade aceito participar deste estudo.

Fui convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa para estudar o funcionamento das glândulas sudoríparas (de suor) de pessoas com suspeita ou diagnóstico de fibrose cística (FC) seguidas no ambulatório de FC da Unicamp.

O funcionamento dessa proteína será avaliado através da coleta do suor realizada por um aparelho chamado Evaporímetro. Este aparelho será colocado em contado com a pele durante cerca 15 de minutos e não oferece risco de queimadura, choque ou dor. O tempo total de duração será de cerca de 60 minutos (1 hora).

Serei submetido a um teste para determinar a mínima quantidade de suor possível que o aparelho pode medir. Para isso durante ocasiões diferentes serei submetido a injeções repetida, sendo 3 em cada dia de teste. Cada teste irá usar a mesma dose de atropina, mas as doses sucessivas do cocktail β-adrenérgico que é o que estimula o suor serão de 0,1%, 1%, 5%, 10%, 20% e 100% da dose máxima. Em cada dia de teste apenas 2 doses diferentes serão usadas em áreas da pele próximas. Deverei repetir o teste em três ocasiões, com um intervalo de pelo menos um dia entre cada teste. O risco destas injeções além da dor pela punção é de provocar vermelhidão e coceira no local. Todos esses riscos são reversíveis (desaparecem) e não devem durar mais de 15 minutos. Existe o risco teórico das drogas utilizadas, mas como a dose aplicada durante o teste é muito pequena, também fui informado que este risco é também pequeno e que não foi observado em nenhum dos estudos realizados com o mesmo propósito antes. O risco destas injeções além da dor pela punção é de provocar vermelhidão e coceira no local. Todos esses riscos são reversíveis e não devem durar mais de 15 minutos.

Existe o risco teórico de provocar alterações sistêmicas, mas como a dose aplicada durante o teste é muito pequena, também fui informado que este risco é também pequeno e que não foi observado em nenhum dos estudos realizados com o mesmo propósito antes.

DETALHAMENTO DOS EFEITOS COLATERAIS:

1)Um indivíduo apresentou uma leve sensação de queimação após a injeção do cocktail β – adrenérgico que melhorou depois de 5 minutos sem qualquer intervenção(não foi feito nada).
2) Um sujeito experimentou coceira no local da injeção, que parou após o término do teste. Nenhuma reação sistêmica ou local grave foi relatada em um estudo recente em San Diego e Toronto testando um total de 171 sujeitos com e sem FC. [Quinton P, Molyneux L, W Ip, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, Conrad D, Shamsuddin AK, Durie P, Gonska T. A secreção de suor beta-adrenérgico como um teste de diagnóstico para a Fibrose Cística. Am J Respir Crit Care Med. 2012 02 de agosto].

Em teoria, os efeitos colaterais sistêmicos em altas concentrações (quantidades) são:

- Do isoproterenol e aminofilina: vermelhidão, dor de cabeça, taquicardia (aceleração do coração), dor abdominal, palpitações, tremores, cãibras musculares transitórias, nervosismo, tontura, dor de cabeça, insônia, náuseas(enjoo), fraqueza, hipertensão (pressão alta).

-Da atropina: rubor (vermelhidão da face), tremor, palpitações, tonturas, fotofobia (sensibilidade a luz), náusea, boca seca, diminuição da sudorese e dificuldade para urinar.

- Do carbacol: rubor, diarreia, náuseas, dor abdominal ou cólicas, aumento da saliva, suores incomuns, alterações na visão.

Devido à dosagem muito baixa utilizada destas drogas neste estudo o risco de efeitos secundários sistémicos é insignificante.

Todas as doses de medicamentos estão bem abaixo daquelas comumente aplicadas na prática clínica *:

• injeção intraocular de carbachol é normalmente usada em doses 5.000 vezes mais elevada do que a dose proposta para injeção intradérmica.
• injeção intravenosa ou intradérmica de atropina é utilizado em doses de 150 x superiores à dose proposta para injeção intradérmica.
• injeção intravenosa ou intradérmica de isoproterenol é utilizado em doses de aproximadamente 50 a 250 vezes mais elevadas do que a dose proposta para injeção intradérmica.
• A injeção intravenosa de aminofilina é usado em doses 250 vezes mais elevadas do que a dose proposta para injecção intradérmica.

* Todas as estimativas são baseadas em um sujeito com um peso corporal de 50 kg.

Li a folha e fui esclarecido (a) dos riscos.

Sei que com este estudo não receberei nenhum benefício financeiro para que esses procedimentos sejam realizados. A única vantagem que poderei ter é saber os resultados dos exames. No entanto, fui informado (a) que se for detetcada alguma alteração, serei imediatamente comunicado (a). Qualquer dúvida poderei contatar a Unicamp no tel. (019) 35218983- Laboratório onde será realizado o teste(LAFIP).

Todos os resultados ficarão em absoluto sigilo, estando somente disponíveis para pesquisa, no caso de publicação científica, nenhum nome de paciente será divulgado.

Estou ciente que poderei abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo após a assinatura deste termo. Concordo em participar dessa pesquisa e sei que receberei uma cópia deste consentimento livre e esclarecido por mim assinado. Declaro que li esse documento e sempre que tiver alguma dúvida sobre este estudo serei prontamente esclarecido sobre o mesmo pelos pesquisadores.

Nome, assinatura e RG do sujeito da pesquisa

_____

Nome, assinatura e RG do responsável legal

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Maria de Fátima Servidoni (Gastropediatra) telefone: 19- 35218983

Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro (Gastropediatra) telefone: 19- 35217395

Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro (Grupo FC/Unicamp) telefone:19-35218983

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) 3521-8936.**

ANEXO II – PARECER

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da correlação entre a função da CFTR (Cystic Fibrosis Transmenbrane Regulator) resultante da estimulação ß-adrenérgica das glândulas sudoríparas comparada a função da CFTR em biópsia retal ex vivo

Pesquisador: Maria de Fatima Correa Pimenta Servidoni

Área Temática: Área 4, Equipamentos, insumos e dispositivos para saúde novos, ou não registrados no país.

Versão: 1

CAAE: 13215913.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 233.183

Data da Relatoria: 26/03/2013

Apresentação do Projeto:

Os pacientes com fibrose cística (FC) apresentam um transporte anormal de íons, o que promove uma concentração elevada de cloreto e de sódio no suor. O teste do suor é considerado por grupos de consenso como o "padrão ouro" para o diagnóstico de FC. Porém, este teste tradicional faz um diagnóstico qualitativo e somente diferencia os indivíduos saudáveis dos com FC clássica. O espectro da FC é bem amplo, e pode ter manifestações diversas, com gravidade mais branda,porém sempre de curso crônico. Para entendimento, diagnóstico e tratamento adequados desta enfermidade, são necessários testes que possam quantificar a atividade da proteína CFTR. A proposta do presente projeto é cotribuir nesse sentido, através do estudo da função da proteína em qustão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Estudar a função da proteína CFTR-Cl das glândulas sudoríparas, por estimulação ß-adrenérgica da transpiração.
- Comparar com a função da CFTR-Cl em epitélio de mucosa intestinal, em biópsias retais ex vivo e com o TS clássico.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

Objetivo Secundário:

A) Correlacionar a função da proteína CFTR pela estimulação ß-adrenérgica das glândulas sudoríparas, em sujeitos com FC clássica, com 2 mutações classe I,II e III (Grupo I)-com o TS clássico e com função da CFTR -Cl ex vivo por biópsia retal realizadas em estudo anterior.

B)Correlacionar a função da proteína CFTR pela estimulação ß-adrenérgica das glândulas sudorípara em sujeitos com suspeita de FC (Grupo II)- com o TS clássico e com função da CFTR -Cl ex vivo por biópsia retal realizadas em estudo anterior.

C) Correlacionar a função da proteína CFTR pela estimulação ß-adrenérgica das glândulas sudorípara em sujeitos portadores de 1 mutação classe I,II e III, pais de pacientes, (Grupo III)-com o TS clássico e com função da CFTR -Cl ex vivo por biópsia retal realizadas em estudo anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relativos à estimulação da sudorese:

1) dor durante a injeção das drogas intradérmicas.

2) reação local discreta com hiperemia e prurido. Estudos anteriores realizados na década de 1980 não relataram quaisquer efeitos secundários utilizando injeção intradérmica de ß-adrenérgicos em 85 estudos ou de iontoforese com estimulação ß-adrenérgica em 38 indivíduos (ver detalhes e referências abaixo). Além disso, o aumento da

experiência recente com todos os 3 métodos de estimar com injeções intra-dérmicas mostrou um risco global de 1,5% para a reação local discreta, mas não observaram quaisquer efeitos colaterais sistêmicos. Deste modo, estes testes podem ser aplicados com segurança em estudos clínicos.

Especificação de efeitos colaterais: 1) Um indivíduo apresentou uma leve sensação de queimação após a injeção do cocktail ß adrenérgico que melhorou depois de 5 minutos sem qualquer intervenção. 2) Um sujeito experimentou prurido no local da injeção, que parou após o término do teste.

Nenhuma reação sistêmicas ou local grave foi relatada em um estudo recente em San Diego e Toronto testando um total de 171 indivíduos com e

sem CF. (Tanja) [Quinton P, Molyneux L, W Ip, Dupuis A, Avolio J, Tullis E, Conrad D, Shamsuddin AK, Durie P, Gonska T. a secreção de suor betaadrenérgico

como um teste de diagnóstico para cística Fibrosis.Am J Respir Crit Care Med. 2012 02 de agosto]. Em teoria, os efeitos colaterais

sistêmicos em altas concentração são: - Do isoproterenol e aminofilina: vermelhidão, dor de cabeça, taquicardia, dor abdominal, palpitações,

tremores, câibras musculares transitórias, nervosismo, tontura, dor de cabeça, insônia, náuseas, fraqueza, hipertensão. -Da atropina:rubor, tremor,

palpitações, tonturas, fotofobia (sensibilidade a luz), náusea, boca seca, diminuição da sudorese e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

dificuldade para urinar. - Do carbacol: rubor,
diarréia, náuseas, dor abdominal ou cólicas, aumento da saliva, suores incomuns, alterações na visão. Devido à dosagem muito baixa utilizada
destas drogas neste estudo o risco de efeitos secundários sistêmicos é insignificante. Todas as doses de medicamentos estão bem abaixo daquelas
comumente aplicadas na prática clínica *: - injeção intra-ocular de carbachol é normalmente usada em doses 5.000 vezes mais elevada do que a
dose proposta para injeção intradérmica. - injeção intravenosa ou intradérmica de atropina é utilizado em doses de 150 x superiores à dose
proposta para injeção intradérmica. -injeção intravenosa ou intradérmica de isoproterenol é utilizado em doses de aproximadamente 50 a 250
vezes mais elevadas do que a dose proposta para injeção intradérmica. A injeção intravenosa de aminofilina é usado em doses 250 vezes mais
elevadas do que a dose proposta para injeção intradérmica. * Todas as estimativas são baseadas em um sujeito com um peso corporal de 50 kg.

Benefícios:

Os benefícios oferecidos por esta pesquisa são aplicáveis aos pacientes com suspeita de FC através da possibilidade de elucidação diagnóstica de sua enfermidade por meios de diagnósticos mais acurados e a toda comunidade científica, por meio da publicação e divulgação dos resultados, tornando possível conhecer e entender melhor o espectro da FC em nosso meio. Não será oferecido nenhum apoio financeiro para a participação dos voluntários e pacientes na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo bem elaborado, com redação clara, bem suportado pela literatura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os termos obrigatórios e a folha de rosto assinada pelo superintendente do HC. No projeto consta local para assinatura dos responsáveis pelo CIPED. O TCLE é claro e expõem os possíveis riscos e desconfortos para os participantes da pesquisa.

Recomendações:

Recomendo aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS MEDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Em reunião de 26 de março de 2013, mantida aprovação.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

CAMPINAS, 26 de Abril de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO III – FICHA CLÍNICA _

Evaporimetria: curva de normalidade (sujeitos sem nenhuma mutação CFTR) da população de Campinas SP

Nome:_____

Telefone: ( )_____Data de nascimento: ____/____/_____

Sexo: ( ) F ( )M Peso: _____ kg Altura: _____m

Comorbidades:

HAS: ( ) Sim ( ) Não

DM: ( ) Sim ( ) Não

Pneumopatias: ( )Não ( ) Sim : _____

Cardiopatias: ( )Não ( ) Sim : _____

Outras: _____

Tabagista: ( ) Sim ( ) Não ( ) Ex-tabagista, parou há _____

Medicação em uso:

_____

_____

Antecedentes familiares:

_____

_____

TESTE DO SUOR Data: ____/____/_____

Teste do suor (mEq/L)	Cl^- / Na +
	/
	/
	/

DOR:

EVAPORIMETRIA Data____/____/_____

Evaporimetria	Colinérgica	B-Adrenérgica

DOR:

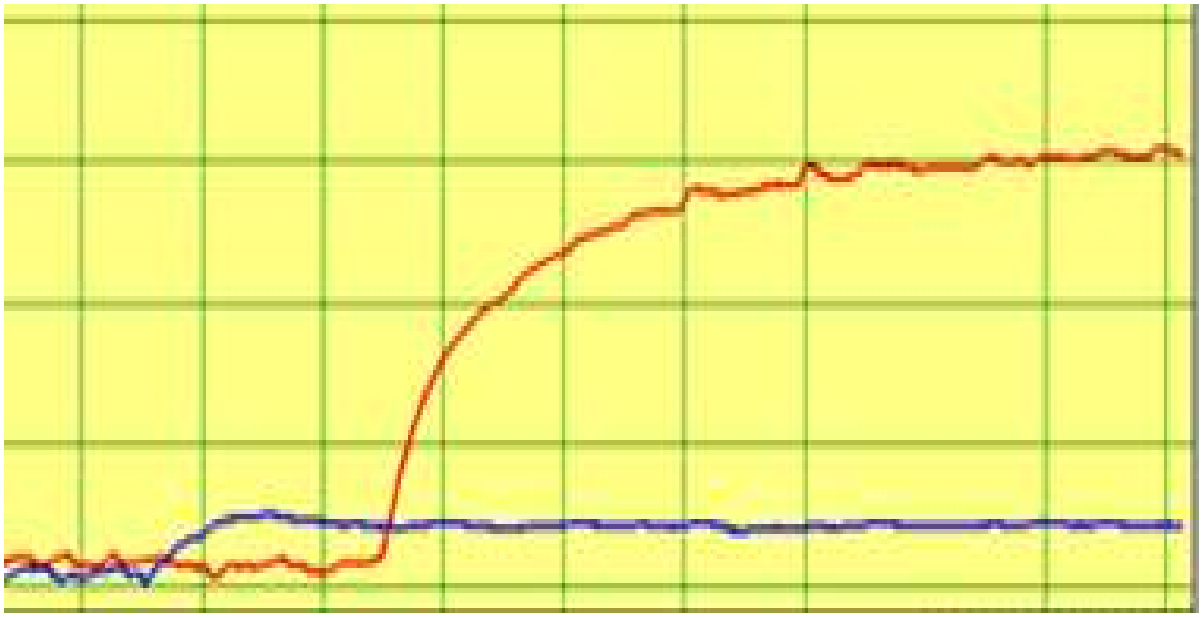
FUNÇÃO PULMONAR Data: ____/____/_____

Função Pulmonar	
VEF1%	
CVF%	
VEF (25-75)	

COLETA DE SANGUE (ESTUDO GENÉTICO) Data: ____/____/_____

ANEXO IV - MANUAL PADRÃO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Medição da taxa de suor usando evaporímetro após estimulação β-adrenérgica



Traduzido da versão original em inglês
by Tanja Gonska, Paul Quinton, Wan Ip, Julie Avolio and Laura Molyneux
and the Sweat Rate Consortium

Tabela de conteudo

Teste de evaporação de Suor - SOP	
Seção I: Preparação 1 Equipamento e especificações 2.1 Preparação da Droga* 2.2 Injeção da Droga 3 Setup do Evaporimetro	Páginas 3-5
Seção II: Protocolo de Teste 1 Preparação inicial 2 Medida basal 3 Teste da secreção de suor 4 Avaliação dos dados	Páginas 6-11

Seção 1: Preparação

1. **Equipamento e Especificações**

Drogas para estimulação de suor por injeção intracutânea	**Fornecedores**
Atropina 0.6 mg/ml injetável	Sandoz (ou equivalente)
Carbacol (Miostat) Solução intraocular 0.01%	Alcon
Isoproterenol (Isuprel) Solução de injeção a 0.02%	Sandoz (ou equivalente)
Aminofilina solução de injeção a 2.5%	Hospira (ou equivalente)
Cloreto de Sódio a 0.9%	Baxter (ou equivalente)

Características dos Injetores	**Fornecedores**
Seringa de 1ml látex free	BD
Agulha para injeção intradérmica	Becton Dickinson
Outros Suprimentos	
Compressa de Álcool a 70% uso único	Próprio do Serviço
Compressa de Gaze	Próprio do Serviço
Óleo Mineral	Próprio do Serviço
Descarpacks	Próprio do Serviço

Equipamento de Medida da Secreção de Suor	**Fornecedor**
Evaporímetro/probes TEWL/ software DASYLab	cyberDERM Inc.
WLRawData.xls file (electronic copy)	cyberDERM Inc.
Excel sheet for data transfer (electronic copy)	Gonska lab
EVAP Datasheet (hard copies)	Gonska lab

2.1.Preparação da Droga:
Cada droga deve ser preparada pela farmácia com a diluição especificada.

Carbacol (Miostat) solução intraocular 0.01% Dosagem: Concentração final = 100ng/ml; 10-7M (0.00001%) Preparação: Usar seringa de 1 ml sugar o volume desejado. 1) Pegar 0.1ml Carbacol 0.01% e adicionar 1 ml de NaCl a 0.9% estéril—[10-5M] 2) Pegar 0.1 ml da solução (item 1)e adicionar 10 ml de NaCl a 0.9% estéril —[10-7M] 3) Pegar uma nova seringa/agulha para sugar **0.1 ml** do passo 2, Solução de Carbacol [10-7M] para injeção Intracutânea= intradermica (ID)
Injeçao de Sulfato de Antropina solução a 0.06% (0.6 mg/ml) Dosagem: Concentração final = 0.44mg/ml; 10-4M (8g Atropina) Preparação: Usar seringa de 1ml para sugar a droga 1) Pegar 0.2 ml de Sulfato de Antropina solução a 0.6% e adicionar em 2.5 ml de NaCl a 0.9% estéril—[Atropina 10-4M] 2) Pegar uma nova seringa/agulha para sugar **0.2 ml** de Atropina 10-4M para injeção Intracutânea (ID)
β-Cocktail: Sulfato de Antropina a 0.06% + Isoproterenol (Isuprel) Solução injetável 0.02% + Aminofilina solução injetável 2.5% Dosagem: - cocktail é composto por 0.004% Atropina, 0.002% Isoproterenol, 0.46% Aminofilina; correspondendo a 8 g de Atropina, 4 g de Isoproterenol e 0.9mg Aminofilina Preparação: Usar seringa de 1ml para sugar a droga 1) 0.2 ml Sulfato de Antropina a 0.06% 2) 0.3 ml Isoproterenol a 0.02% 3) 0.5 ml Aminofilina a 2.5% 4) Adicionar as drogas dos itens acima em 1.7 ml de NaCl a 0.9% estéril– [Final - cocktail] 5) Pegar uma nova seringa/agulha para sugar **0.2 ml** do cocktail para injeção Intracutânea

Toda a preparação das drogas deve ser feita pela farmácia institucional.

2.2. Preparação da Droga

A. Prepare seringas de 1ml para 4 injeções como requerido
1. Injeções de Antropina: Prepare **2** seringas com 0.2 ml de solução de Atropina
2. Injeção de Carbacol: Prepare **1** seringa com 0.1 ml de Carbacol
3. Injeção de β-cocktail: Prepare **1** seringa com 0.2 ml de solução β-cocktail e coloque depois agulha de insulina (para injeção intradermica)

3. Set-Up do Evaporímetro e do DaisyLAb

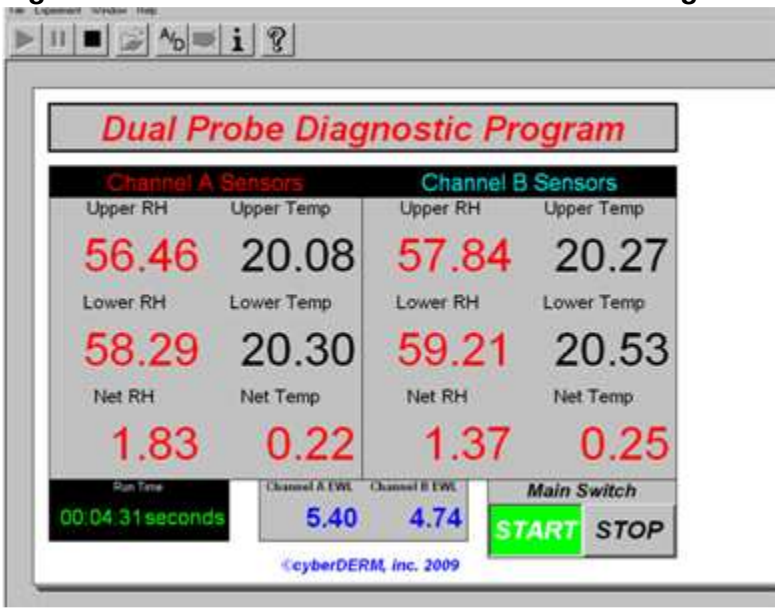
A. Limpe o Evaporímetro TEWL e os probes enxugando o fundo do sensor cilíndrico com um cotonete embebido em álcool, secar com ar. O B-blue TEWL probe é a REFERÊNCIA e o A-red TEWL probe é o MEDIDOR.

B. Faça um diagnóstico antes de iniciar cada experimento:
1. Ligue o dispositivo EVAP
2. Abra o Excel worksheet entitulado: 'WL Raw Data.xls'

3. Abra o ‘a.1 Menu RG1 1.03’ para executar o menu.

4. Abra o Powerpoint (minimize) para criar uma cópia da tela (print screen copy)
5. Faça o Diagnóstico (F5)
6. Siga as instruções na tela conforme avança no programa. (Move on Dual, Yes, Diagnostic)
7.Após o programa de diagnostico rodar por 2 minutos. Pressione stop, Print Screen e copie e cole no slide do powerpoint (Conforme Fig. 1).

Figure 1: Janela de diagnóstico no DASYL



Seção II: Protocolo de Teste

1. Preparação Inicial:

Manual de Gravação das medidas do evaporímetro (EWL) no EVAP Datasheet
Data, tempo, identificação do sujeito e operador da ficha técnica.
Como estudo para a documentação.
Grave os pontos do tempo nos quais a droga é injetada

B. *Evaporímetro computadorizado: como se segue*: WLRawDATA.xls deve ser executado no momento da gravação (deve ser aberto antes de iniciar o DASYLAB). As medidas de ambos os “probes” devem ser gravadas (EXCEL sheet RawA e RawB)

2. Linha de base das medidas:

A. A pessoa que vai realizar o teste deve se sentar de forma confortável, apoiar e esticar o antebraço direito sobre uma superfície reta. Limpe uma área da pele no terço superior do antebraço,limpe o local com água, depois com algodão embebido em álcool e ar seco.
B. Limpe a superfície da sonda TEWL com algodão embebido em álcool (caso não tenha sido feito antes).
C. Coloque as duas sondas TEWL sobre o braço do sujeito e fixe-as no local usando faixas de borracha simples. *A Referência (B-azul da sonda) vai na lateral externa do braço direito do paciente e a Medida (A-vermelho da sonda) vai para a face interna do braço direito.*

D. Deve manter a sonda perpendicular à pele ao longo de todas as medições. A orientação vertical é essencial para a precisão (ver Fig. 2).

Figure 2: Orientação perpendicular do probe

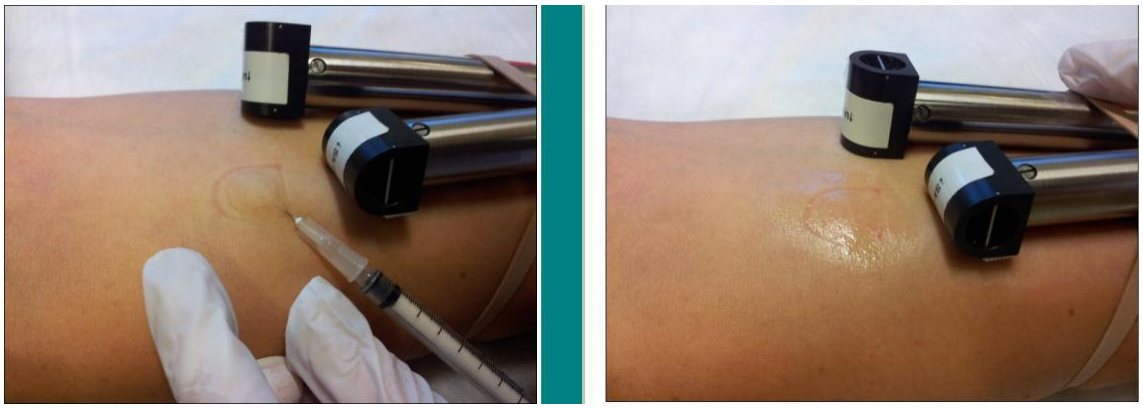
E. Volte para DASYLab (*diagnostic screen*), pressione *start* para a ver menu principal, em seguida- rapidamente clique em Iniciar (*start*)para selecionar para a medição.
F. Clique em "Medição"(*Measurement*) para começar a gravação. Você será solicitado a introduzir o Run # 4. Então pressione *'START'* no DASYLab para iniciar a medição.
G. Aguardar que a linha de base EWL se torne estável por cerca de 2 minutos (4-5 min total).

- **A leitura da linha de base deve estar entre (5-15) e A e B entre com intervalo de 5 entre cada um.**
- **Os valores altos indicam alta transpiração (paciente está se sentindo quente). Neste caso, esperar até o paciente se esfriar e os valores caírem. Ou remova o probe, limpe a pele do paciente com uma gaze seca ou tente outro local.**
- **Se você tem uma leitura negativa, o probe pode estar de cabeça para baixo.**

3. Teste da Secreção de suor: evaporimetria (medições EWL)

A. *REFERÊNCIA (B-Blue probeTEWL)*
Inibição com atropina
1. Remover o probe, limpar o local com álcool. Usando a seringa de 0,2 ml de atropina, inserir intradermicamente, em seguida introduzir a agulha para o centro da área de teste. Injetar o conteúdo da seringa de modo a formar uma pápula de diâmetro <1 cm.

Deve ser tomado cuidado para que local da punção esteja fora da área de medição do probe.



2. Limpar o local de injeção com óleo mineral. O excesso de óleo irá interferir com a transpiração. Seque o excesso de óleo com uma gaze macia. Em seguida, recoloque o probe no local de forma que o local da punção da agulha esteja fora ou apenas na borda da área da sonda de medição(do probe).
Esta sonda irá registrar e gravar a transpiração da pele e vai permanecer durante todo o teste. Os dados serão salvos automaticamente no arquivo eletrônico "RawB".

- *Será necessário controlar a posição da sonda ao longo do teste e reajusta-la conforme necessidade para manter a posição perpendicular à pele.*

B. MEDIÇÃO (A-Red- probe TEWL)

i. Estimulação colinérgica

1. Para a sonda de medida, marcar a pele em torno da sonda de modo que ela possa ser substituído sobre o mesmo local mais tarde, muitas vezes a pressão da sonda vai deixar uma marca bem visível na pele.

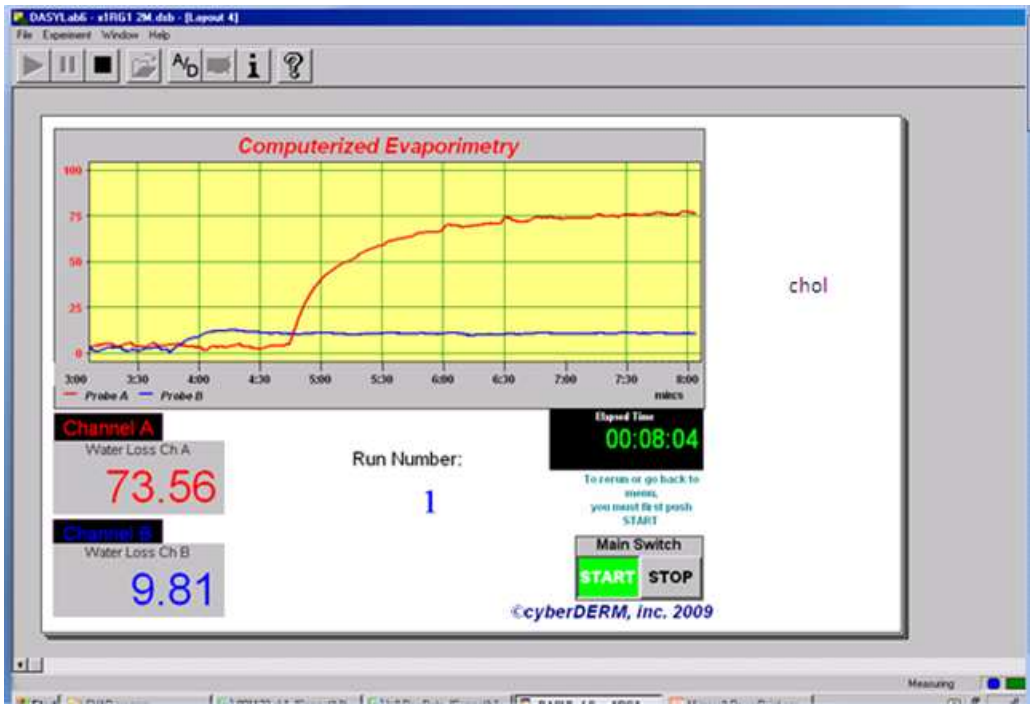
2.Limpe a área de teste com uma gaze com álcool e ar seco. Usando a seringa com 0,1 ml Carbacol, inserir intradermicamente, em seguida,introduza a agulha para o centro da área. Injetar o conteúdo da seringa de modo a formar uma pápula de diâmetro <1 cm.

3.Limpe o local onde foi feito a injeção com óleo mineral. O excesso de óleo irá interferir com a transpiração. Seque o excesso de óleo com uma gaze macia. Em seguida, substitua sonda no local de forma que o local da punção da agulha esteja fora ou apenas na borda da área de sonda de medição. Esta sonda irá gravar a transpiração térmica. Os dados serão salvos automaticamente no arquivo eletrônico em "Rawa".

4. Medições são registradas pelo evaporímetro até que seja alcançado um patamar de equilíbrio e registrado por mais 2 min. Se um patamar definido não pode ser alcançado, registrar a resposta colinérgica durante o mínimo de 8 minutos e máximo de 10 minutos. (ver a fig. 3).

- A resposta colinérgica é geralmente acima de 30,deve estar no intervalo de (30-100); idealmente acima de 60. Se não, você terá de re-injetar em um novo local.

Figura 3: Leitura EWL



Linha Vermelha: resposta Evaporímetro após a injeção colinérgica.

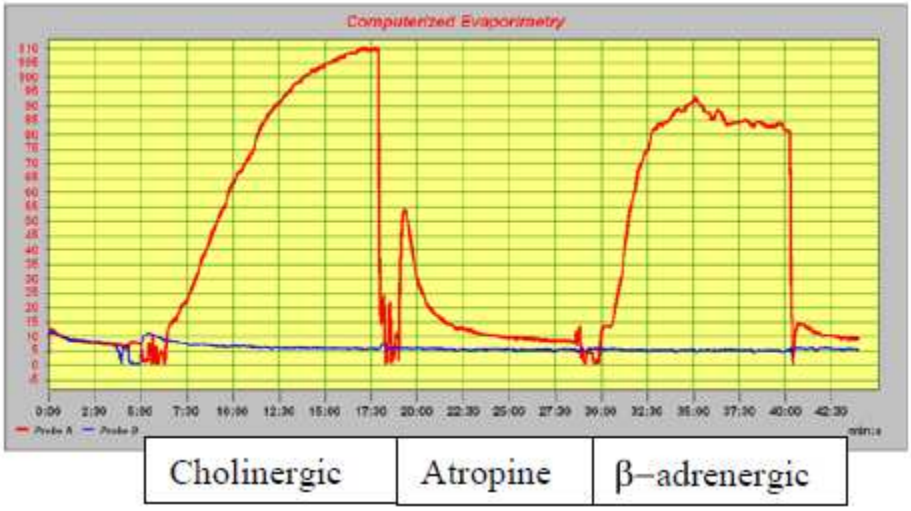
Linha azul: resposta Evaporímetro após atropina, linha de referência.

ii: Inibição com Atropina

1. Remover A-Red sonda TEWL. Limpe suavemente com álcool seque com ar seco a área da pele sobre e em torno pápula.
2. Injete **0,2 ml da solução de Atropina** da mesma maneira como acima (Use o local da mesma punção como antes).
3. Limpe a área de pápula e ao redor com óleo mineral. Seque o excesso de óleo com uma gaze macia.
4. Faça as medições registradas no evaporímetro até que seja alcançado um patamar de equilíbrio e registrado por mais 2 min. Se um patamar definido não pode ser alcançado, registrar a resposta atropínica durante o mínimo de 8 minutos e máximo de 10 minutos. .

iii. Estimulaçãoß-adrenérgica (função CFTR):
1.Remover A-Red sonda TEWL. Limpe suavemente com álcool seque com ar seco a área da pele sobre e em torno da pápula.
2. Injete 0,2 ml solução Cocktail-ß da mesma maneira como acima (Use o local da mesma punção como antes).
3. Limpe a área de pápula e ao redor com óleo mineral. Seque o excesso de óleo com uma gaze macia.
4. Faça as medições registradas no evaporímetro até que seja alcançado um patamar de equilíbrio e registrado por mais 2 min. Se um patamar definido não pode ser alcançado, registrar a resposta solução Cocktail-ß durante o mínimo de 8 minutos e máximo de 10 minutos.
CAVE: Esta resposta é tipicamente mais lenta.
C. pós-teste MEDIÇÃO LEM BASAL:
1. Mover as sondas de TEWL a nova área (mais de 2 cm de distância da área estimulada).
2. Permitir TEWL para estabilizar pelo menos durante 2 minutos.
3. Probes A e B devem voltar a leituras iniciais.

D. parar a gravação
1. 'STOP' de imprensa para gravação de dados.
2. Imprimir tela do traçado (ver fig. 4) e cópia para powerpoint, salvar o arquivo com código identificador.
3. Pressione "Alt e F4" para fechar DASYLab.
Figure 4: EVAP test tracing



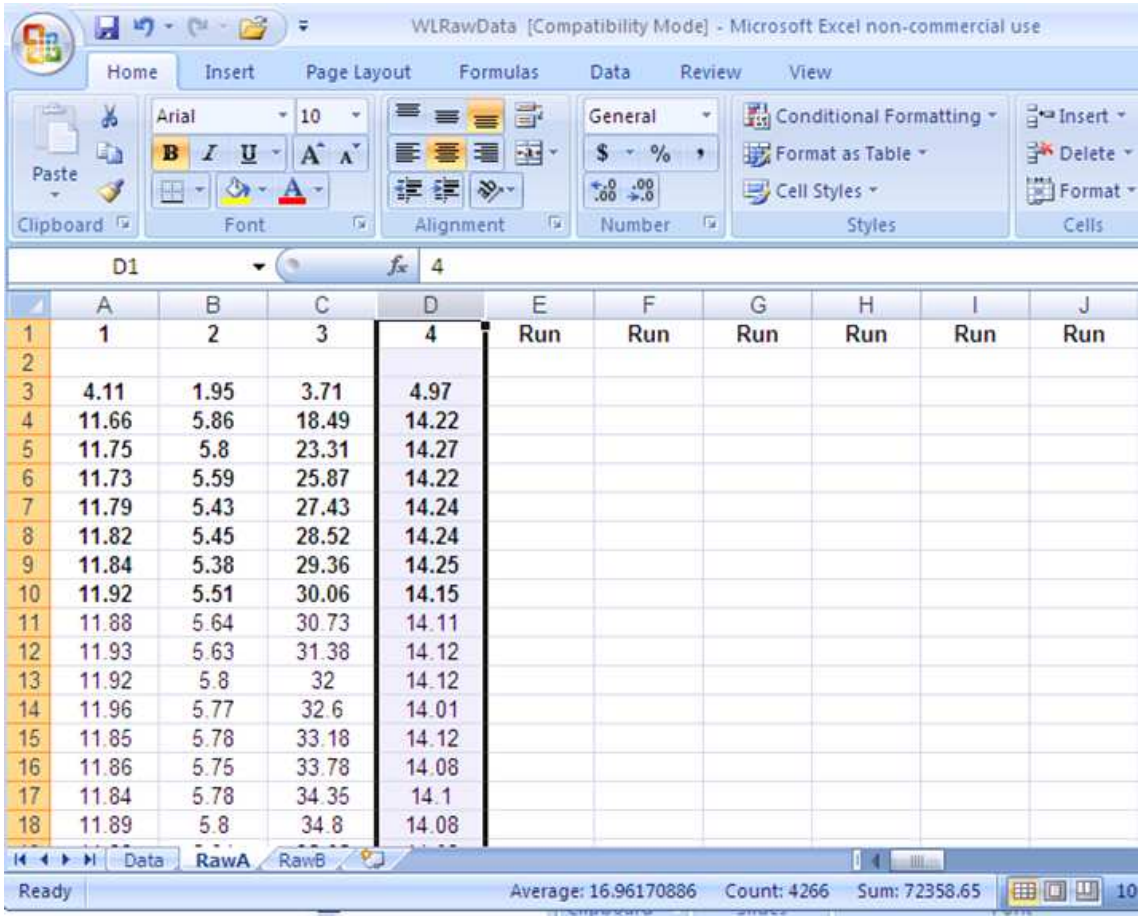
4. **Gestão de dados**

A. O arquivo WLRawData.xls: cópiar para "Evaporimeter_patientcode_date of test"
i. Os dados da experiência aparecem na coluna # 4 (A Raw & B)
ii. Copiar a coluna # 4 de WLRawData A (ver a Fig. 5.), Colar em coluna A de arquivo Evap_patient_date file: Raw coluna A-4 (Fig. 6). Em seguida, copie a coluna # 4 de WLRawData B, colar em coluna I do arquivo Evap_patient_date file: coluna Raw B-4.
Insira o tempo em minutos da injeção de drogas no arquivo Evap_patient_date, adicione Patient identifier(*GOAL-OB-11_Site#_Subject#_SubjectInitials)*
Visit Date(YYYYMMDD) Visit Number(A/B)

Use A, se apenas um teste evaporímetro foi feito para os assuntos sobre esta visita. Use B se o teste evaporímetro teve que ser repetido no mesmo dia, devido a problemas com o primeiro teste. Enviar arquivos de dados de A e B para Toronto
iii. Anote o nome do arquivo da folha de Excel para transferência de dados:

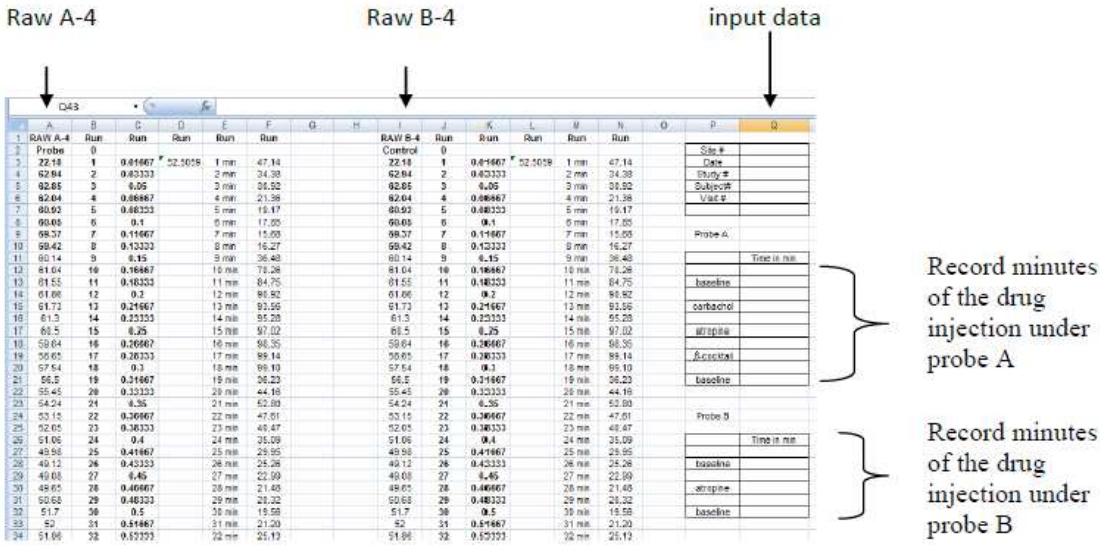
Filename: META-OB-11_Site # # _Subject _SubjectInitials_VisitNumber (A / B) Data _Visit (AAAAMMDD)
Filename: GOAL-OB-11_Site#_Subject#_SubjectInitials_VisitNumber(A/B)_Visit Date(YYYYMMDD)
(e.g., GOAL-OB-11_001_001_ABC_V1A_20120120)
(por exemplo, a GOAL-OB-11_001_001_ABC_V1A_20120120)
Por favor atenção, se dois testes do evaporímetro são feitos na mesma visita, certifique-se de rotular o nome do arquivo Visita # e A ou B (por exemplo V1A, ou V1B)
iv. Salve este arquivo em conjunto com a tela de impressão ppt. arquivo com o mesmo identificador.

B. Enviar a SickKids
arquivo do PowerPoint com a experiência de tela de impressão
arquivo de dados eletrônico
Folha de registo de dados
Figura 5: Folha WLRawData.xls

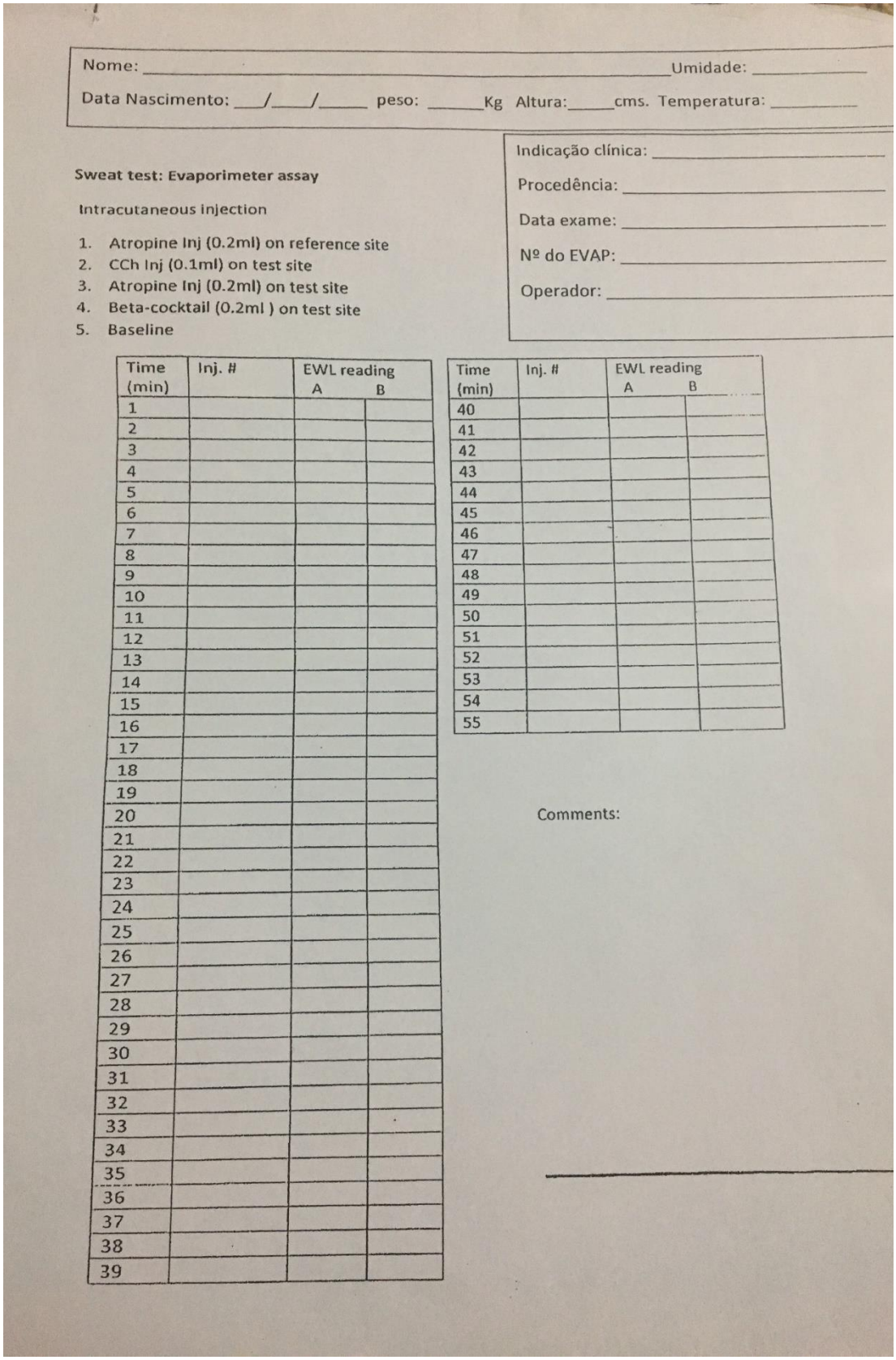


	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	1	2	3	4	Run	Run	Run	Run	Run	Run
2										
3	4.11	1.95	3.71	4.97						
4	11.66	5.86	18.49	14.22						
5	11.75	5.8	23.31	14.27						
6	11.73	5.59	25.87	14.22						
7	11.79	5.43	27.43	14.24						
8	11.82	5.45	28.52	14.24						
9	11.84	5.38	29.36	14.25						
10	11.92	5.51	30.06	14.15						
11	11.88	5.64	30.73	14.11						
12	11.93	5.63	31.38	14.12						
13	11.92	5.8	32	14.12						
14	11.96	5.77	32.6	14.01						
15	11.85	5.78	33.18	14.12						
16	11.86	5.75	33.78	14.08						
17	11.84	5.78	34.35	14.1						
18	11.89	5.8	34.8	14.08						

Figure 6: Evap_patientcode_date of test



ANEXO V – Ficha de Controle do Evaporimetro



Nome: _____ Umidade: _____

Data Nascimento: ___/____/_____ peso: _____Kg Altura:_____cms. Temperatura: _____

Indicação clínica: _____

Procedência: _____

Data exame: _____

Nº do EVAP: _____

Operador: _____

Sweat test: Evaporimeter assay

Intracutaneous injection

1. Atropine Inj (0.2ml) on reference site
2. CCh Inj (0.1ml) on test site
3. Atropine Inj (0.2ml) on test site
4. Beta-cocktail (0.2ml) on test site
5. Baseline

Time (min)	Inj. #	EWL reading A	B
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			

Time (min)	Inj. #	EWL reading A	B
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			

Comments:

ANEXO VI– Escala visual analógica de dor (EVA)

- Escala visual analógica de dor (EVA) (Jenson, MP 1986)

ANEXO VII – TABELA COM RESULTADOS TESTES

PACIENTE	cch_pico_BD	minimo_atropina_BD	ßCock_pico_BD	relação_ßCock/Cch_BD	cch_pico_BE	minimo_atropina_BE	ßCock_pico_BE	relação_ßCock/Cch_BE	teste_suor_BD	teste_suor_BE
1.	77,99	8,96	37,00	0,406	79,18	10,18	46,00	0,519	22,34	23, 47
2.	92,19	9,05	98,50	1,076	86,61	8,21	78,14	0,892	26,14	27,26
3.	84,61	4,75	68,10	0,793	81,77	6,41	63,46	0,757	28,97	21,01
4.	86,56	12,27	88,28	1,023	92,81	11,96	87,10	0,929	25,40	27,61
5.	80,49	7,32	39,06	0,434	60,01	6,13	25,72	0,364	23,92	23,92
6.	70,02	10,52	40,00	0,495	76,62	12,64	38,45	0,403	18,25	18,25
7.	68,89	9,83	74,70	1,098	77,29	10,20	69,85	0,889	30,26	20,36
8.	93,52	14,31	94,52	1,013	93,61	9,23	87,71	0,930	38,87	32,05
9.	75,59	15,38	58,04	0,709	73,82	10,79	44,87	0,541	16,99	31,75
10.	72,03	14,75	70,36	0,971	73,61	14,43	71,37	0,962	22,99	19,09
11.	77,90	13,47	89,12	1,174	82,30	12,94	85,91	1,052	16,27	18,37
12.	77,15	9,78	56,31	0,691	81,65	10,76	65,77	0,776	29,07	35,08
13.	74,09	13,60	83,35	1,153	81,41	13,60	83,47	1,030	35,68	38,18
14.	78,33	10,41	57,34	0,691	73,70	6,30	50,10	0,650	24,89	28,74
15.	80,60	7,87	70,82	0,866	79,01	9,46	84,11	1,073	27,44	36,29
16.	87,72	8,99	83,97	0,952	83,24	6,50	62,59	0,731	46,87	51,25
17.	85,47	7,04	29,84	0,291	80,77	8,60	26,77	0,252	26,80	34,30
18.	83,47	9,93	77,63	0,921	87,79	10,41	92,11	1,056	43,45	43,01
19.	79,83	11,50	81,75	1,028	85,27	9,92	84,17	0,985	29,07	35,08
20.	84,72	9,22	50,77	0,550	80,94	8,01	47,81	0,546	23,55	23,55
21.	83,36	8,42	84,94	1,021	89,82	11,72	91,22	1,018	23,80	25,70
22.	87,02	10,40	75,07	0,844	82,16	10,49	55,90	0,634	31,68	47,22
23.	84,70	12,64	89,86	1,072	85,71	10,57	94,14	1,112	50,35	46,25
24.	78,15	9,15	44,67	0,515	76,44	11,74	42,63	0,477	25,81	26,78
25.	85,46	12,82	84,37	0,985	95,66	14,19	90,79	0,940	38,57	38,05
26.	96,51	7,89	83,11	0,849	91,56	8,12	68,35	0,722	15,37	30,47
27.	45,62	4,60	11,54	0,169	66,93	3,75	11,91	0,129	74,38	78,52
28.	85,49	6,81	57,00	0,638	67,32	6,01	42,77	0,600	36,01	36,01
29.	98,85	12,99	100,33	1,017	98,81	9,77	94,00	0,946	26,46	27,97
30.	83,14	12,73	85,67	1,036	83,01	11,58	84,41	1,020	31,52	23,86
31.	87,31	10,41	42,62	0,419	94,92	8,32	58,99	0,585	57,33	61,40
32.	91,80	9,73	96,69	1,060	77,61	8,56	95,06	1,253	18,17	32,34
33.	66,08	7,69	64,45	0,972	64,14	7,79	59,35	0,915	29,78	33,40
34.	84,80	10,03	55,54	0,609	79,11	10,08	56,64	0,674	34,07	47,61
35.	78,25	13,28	81,41	1,049	77,83	27,11	82,63	1,095	49,81	48,57
36.	94,16	11,65	89,74	0,946	97,35	9,47	101,70	1,049	19,35	31,89
37.	94,05	5,93	54,00	0,546	66,43	5,36	24,10	0,307	22,13	27,61
38.	97,44	6,23	47,87	0,457	87,33	5,09	29,22	0,293	27,24	21,06
39.	82,90	8,71	47,93	0,529	65,22	8,91	37,88	0,514	27,09	27,79
40.	77,42	11,17	81,22	1,057	79,80	15,30	84,22	1,069	22,14	23,15
41.	82,43	13,36	86,21	1,055	77,93	12,95	78,42	1,008	41,44	47,12
42.	85,11	7,90	10,56	0,034	92,05	12,78	24,16	0,144	58,27	63,00
43.	80,93	11,50	83,01	1,030	89,00	13,96	90,00	1,013	17,42	15,60
44.	96,23	8,97	54,87	0,526	88,10	9,88	63,50	0,686	36,23	33,19
45.	82,30	5,74	70,96	0,852	86,07	6,80	73,74	0,844	19,53	18,23
46.	106,48	10,69	72,56	0,646	98,29	8,63	77,23	0,765	26,67	39,56
47.	89,91	10,52	97,59	1,097	90,99	9,99	93,15	1,027	17,42	15,60
48.	75,17	7,59	46,00	0,568	75,69	7,02	54,40	0,690	15,05	14,73
49.	77,84	13,28	82,85	1,078	81,82	13,85	67,04	0,783	28,76	29,07
50.	95,04	17,62	85,76	0,880	94,61	15,98	84,72	0,874	24,08	20,74
51.	72,00	12,30	63,85	0,863	81,37	14,72	82,49	1,017	29,71	41,62
52.	89,33	8,77	67,40	0,728	90,60	7,24	60,61	0,640	36,47	42,68
53.	68,93	5,99	81,55	1,201	78,73	7,61	78,70	1,000	17,62	18,23
54.	72,92	8,41	39,73	0,486	66,02	8,31	35,15	0,465	27,32	20,40
55.	92,51	8,59	97,86	1,064	86,43	8,24	83,14	0,958	27,24	39,25
56.	77,64	9,62	79,18	1,023	86,86	11,99	79,64	0,904	20,82	15,90
57.	89,38	11,87	94,07	1,061	90,54	10,87	95,86	1,067	49,25	42,68
58.	90,06	15,84	69,25	0,720	87,63	12,47	69,68	0,761	29,71	41,62
59.	76,47	7,73	68,48	0,884	85,30	8,66	81,16	0,946	20,30	20,03
60.	83,72	9,96	39,60	0,402	77,01	11,70	44,17	0,497	35,48	35,48

ANEXO VIII – TABELA COM RESULTADOS ESPIROMETRIA

SUJEITO	VEF1 (L)	VEF1 (%)	CVF(L)	CVF(%)	VF1/CVF (L)	VF1/CVF (%)	VEF(25-75) L	VEF(25-75) %	TEMPERATURA D	UMIDADE D	TEMPERATURA E	UMIDADE E
1	3,36	114	3,82	111	0,880	80	4,17	111	27,00	50,00	27,00	50,00
2	3,08	98	3,54	97	0,870	80	3,39	80	29,00	39,17	28,00	40,00
3	3,34	107	3,86	105	0,865	81	4,17	109	26,50	46,90	25,30	50,40
4	3,57	108	3,97	103	0,899	80	4,05	96	28,64	34,97	29,38	35,39
5	3,04	104	3,44	100	0,884	81	3,62	98	26,68	46,00	27,19	47,80
6	3,81	109	4,76	107	0,800	102	4,09	123	28,25	50,68	28,71	49,35
7	3,59	103	4,48	105	0,801	99	3,29	97	28,00	49,00	29,58	50,09
8	5,20	113	5,98	108	0,870	101	5,96	123	20,13	46,43	25,26	35,34
9	6,43	118	7,50	113	0,857	99	6,63	118	29,35	51,93	27,64	50,96
10	2,93	86	3,47	94	0,844	80	2,75	65	28,00	53,10	26,05	54,70
11	3,97	93	4,35	86	0,913	97	5,32	115	25,78	41,75	25,07	39,47
12	4,21	85	5,24	88	0,803	93	4,35	84	28,00	44,00	28,00	41,00
13	3,48	85	4,05	83	0,859	101	3,94	81	27,00	64,00	28,93	50,38
14	3,33	107	3,43	95	0,971	87	4,01	97	24,08	57,61	27,77	42,28
15	3,34	107	3,86	105	0,865	80	4,17	109	25,00	58,00	27,00	50,00
16	3,47	90	4,04	90	0,859	91	3,67	86	28,68	42,11	29,00	40,04
17	2,56	96	2,93	90	0,874	82	3,11	112	29,19	43,45	29,19	43,45
18	4,47	85	4,95	80	0,903	105	6,31	117	28,41	42,93	46,77	26,72
19	4,56	108	5,25	104	0,869	101	4,65	103	28,66	51,55	29,30	48,79
20	3,24	108	4,00	113	0,810	97	2,93	96	22,04	61,75	27,79	38,21
21	3,01	73	4,14	84	0,727	86	2,49	57	29,83	43,48	27,60	42,70
22	4,37	109	5,02	105	0,871	101	5,24	102	22,88	46,28	27,02	36,40
23	4,46	99	5,16	94	0,864	104	5,36	114	26,43	54,80	29,32	45,26
24	2,51	111	2,76	99	0,909	86	3,35	148	27,40	38,57	28,36	40,69
25	4,77	111	5,40	125	0,883	80	3,93	84	23,06	52,10	23,06	52,10
26	3,07	95	3,77	101	0,814	95	2,88	77	22,22	34,81	27,61	36,69
27	2,71	89	2,82	80	0,961	111	3,57	89	36,42	26,41	28,00	34,78
28	3,11	95	3,64	95	0,854	80	3,28	78	30,00	43,00	28,00	43,00

29	4,87	108	5,58	101	0,873	107	6,65	146	28,40	35,00	29,80	36,40
30	4,21	92	4,78	88	0,881	101	4,28	88	28,22	58,80	29,33	51,20
31	4,97	92	5,59	86	0,889	102	5,15	92	23,03	40,27	24,20	40,20
32	4,36	122	5,14	121	0,848	80	4,32	101	23,00	52,00	23,00	52,00
33	3,71	82	3,02	80	1,228	95	2,95	71	23,40	69,00	27,00	53,00
34	3,19	103	3,43	96	0,930	83	4,20	102	24,52	58,22	28,54	40,38
35	4,41	88	4,79	80	0,921	97	5,39	102	27,58	53,81	28,15	49,37
36	2,50	86	3,02	83	0,828	105	2,60	87	26,21	28,75	27,46	26,35
37	2,68	117	3,28	120	0,817	80	2,93	103	25,00	37,00	25,00	37,00
38	2,87	92	3,34	92	0,859	77	2,82	78	23,00	57,00	27,00	44,80
39	3,36	114	3,82	111	0,880	80	4,17	111	22,40	34,33	22,40	34,33
40	3,69	106	4,60	114	0,802	93	3,04	84	28,82	55,43	26,92	56,49
41	4,50	87	5,55	94	0,811	89	3,98	74	29,59	53,20	28,36	54,64
42	2,93	98	3,15	91	0,930	84	4,00	102	26,11	35,08	28,14	29,67
43	3,28	123	4,10	134	0,800	93	3,04	107	23,00	52,00	26,00	41,00
44	3,17	107	3,45	101	0,919	83	4,44	113	22,71	58,45	22,71	58,45
45	2,86	90	3,07	83	0,932	110	4,89	118	23,00	50,00	26,00	38,00
46	4,52	108	5,25	104	0,861	101	4,65	103	23,00	34,00	23,00	34,00
47	4,29	85	5,13	84	0,836	100	4,32	84	29,79	58,63	28,04	37,07
48	3,54	83	4,33	89	0,818	89	3,27	71	28,16	47,80	26,53	48,45
49	3,44	107	3,92	106	0,878	80	4,06	73	28,00	49,00	28,00	49,00
50	3,11	92	3,74	93	0,832	98	3,07	82	26,36	45,24	28,63	40,30
51	5,29	108	6,21	105	0,852	98	6,14	119	25,09	76,00	29,80	55,40
52	3,08	98	3,54	97	0,870	80	3,39	80	26,10	49,16	28,58	41,53
53	2,57	88	3,47	103	0,741	67	2,14	54	22,22	75,16	28,17	51,17
54	3,79	117	4,36	115	0,869	80	4,32	102	24,00	73,00	24,00	73,00
55	3,01	105	3,48	107	0,865	80	3,53	89	21,29	46,44	32,12	27,34
56	3,44	107	3,92	106	0,878	81	4,06	96	21,91	48,80	36,68	36,68
57	4,30	93	4,84	87	0,888	94	4,69	95	21,82	53,06	26,77	37,58
58	4,73	88	5,89	98	0,803	80	4,20	79	26,55	36,84	35,02	26,34
59	2,95	97	3,28	91	0,899	83	3,70	100	28,74	43,83	27,07	43,25
60	2,76	92	3,28	95	0,841	80	2,80	70	26,70	47,60	28,71	42,80