

IONTOFORESE POR PILOCARPINA: COMPARAÇÃO ENTRE O USO DE CORRENTES CONTÍNUA PULSADA E CONTÍNUA CONSTANTE

C. C. S. Gomez*, M. F. Servidoni*, P. J. C. Canavezi***, A. F. Ribeiro*, J. D. Ribeiro*, E. T. Costa****, F. U. Vieira Junior****

*Centro de Investigação em Pediatria – CIPED/FCM/UNICAMP, Campinas, Brasil

**Centro de Engenharia Biomédica – CEB/UNICAMP, Campinas, Brasil

***Departamento de Engenharia Biomédica – DEB/FEEC/UNICAMP, Campinas, Brasil

****Instituto Federal de São Paulo – IFSP, Campinas, Brasil

e-mail: ubaldo@ceb.unicamp.br

Resumo: O teste do suor clássico (TSC) é uma técnica que utiliza o método de iontoforese por pilocarpina para estimular a produção de suor e posterior diagnóstico de Fibrose Cística pela quantificação do íon Cl^- . Essa técnica requer a determinação do peso exato do suor, idealmente ≥ 75 mg. O objetivo desse trabalho foi comparar a produção de suor e o melhor tempo para estimulação e coleta com o uso de corrente contínua pulsada (CCP) e corrente contínua constante (CCC). Foram realizados dois tipos de experimentos em 48 voluntários, um imediatamente após o outro. O experimento 1 foi realizado no braço direito com CCC e CCP e sem variação no tempo de estimulação e coleta. Foram utilizadas intensidades de corrente de 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mA com frequências de 0; 200; 1000 e 5000 Hz. O experimento 2 foi realizado no braço esquerdo, mantendo a intensidade de corrente fixa e variando o tempo de estimulação com 5 e 10 min e coleta de 15 e 30 min com frequências de 0; 200; 1000 e 5000 Hz. Houve diferença do peso do suor com a frequência do estímulo ($p=0,0168$). A produção de suor foi maior no tempo de 10 min de estimulação e 30 min de coleta em todas as frequências utilizadas ($p=0,0023$). Os autores recomendam que o TSC seja aplicado com corrente de 1 mA e frequência de 1000 Hz com tempo de estimulação de 10 min e tempo de coleta de 30 min.

Palavras-chave: iontoforese, fibrose cística, teste de suor, corrente contínua constante e contínua pulsada.

Abstract: The classical sweat test (CTS) is a technique that uses the iontophoresis method with pilocarpine to stimulate sweat production followed by Cystic Fibrosis (CF) diagnosis via the quantitation of the Cl^- ion present in a sweat sample. This technique requires the exact determination of the weight of the collected sweat, ideally ≥ 75 mg. The objective of this work was to compare the sweat production and the best time for electrical stimulation and sweat collection using direct constant current (DCC) and direct pulsed current (DPC). Two experiments with 48 volunteers were carried out, one immediately after the other. Experiment 1 was carried out in the right arm with DCC and DPC and without variation of stimulation and sweat collection times. We used current intensities of 0.5,

0.75, 1.0 and 1.5 mA with frequencies of 0, 200, 1000 and 5000 Hz. Experiment 2 was carried out in the left arm keeping fixed the current intensity but varying stimulation time (5 and 10 min) and sweat collection of 15 and 30 min, with frequencies of 0, 200, 1000 and 5000 Hz. We observed difference of sweat weight with frequency of the stimulation current ($p=0.0168$). Sweat production was greater with 10 min stimulation time and 30 min of collection time in all frequencies used ($p=0.0023$). Authors recommend that CTS should be done with 1 mA current intensity and frequency of 1000 Hz, 10 min of stimulation and 30 min of sweat collection.

Keywords: iontophoresis, cystic fibrosis, sweat test, direct constant and direct pulsed currents.

Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária, autossômica recessiva multifatorial crônica e de grande letalidade [1]. As manifestações clínicas diferem entre os pacientes variando de acordo com o comprometimento pulmonar e gastrointestinal, sendo a insuficiência pulmonar a principal causa de morte [2].

No Brasil, a incidência estimada para região sul é mais próxima da população caucasiana centro-europeia, enquanto que, para outras regiões, diminui para cerca de 1/10.000 nascidos vivos [3].

Os pacientes fibrocísticos apresentam um transporte anormal de íons, o que promove uma concentração elevada de íons cloreto e de íons sódio no suor. O teste mais aceito para avaliar a quantidade desses íons no suor é baseado na técnica de iontoforese com pilocarpina, descrito por Gibson & Cooke em 1959 [4] e considerado ainda hoje o teste padrão-ouro para o diagnóstico de FC. Essa técnica requer a determinação do peso exato do suor com quantidade mínima de 50mg de amostra [5], idealmente ≥ 75 mg, quantidade de suor necessária para um resultado acurado.

O diagnóstico da FC é confirmado quando os níveis de cloro no suor, medidos em duas dosagens independentes revelam-se acima de 60mmol/L, ou quando são detectadas duas mutações para FC em estudo genético, ou quando existe alteração da medida

da diferença de potencial nasal (teste realizado em poucos serviços) associada a quadro clínico compatível com a doença.

Apontamentos importantes têm sido realizados por pesquisadores quanto aos procedimentos e equipamentos utilizados para o Teste do Suor [6]. Estudos recentes mostraram a dificuldade dos centros de referência em FC na aplicação dos testes de suor com falta de uniformidade nos testes, necessidade urgente de treinamento dos operadores e de equipamentos e insumos adequados à necessidade brasileira [7].

Os dispositivos hoje utilizados no Brasil para diagnóstico de FC são em sua maioria equipamentos importados e sem registro na ANVISA, mais especificamente o sistema microtubo capilar (Wescor Macroduct®) que usa kit proprietário e patenteado para realização dos testes utilizando a medida de condutividade que é uma técnica que não quantifica a concentração de íons Cl^- e íons Na^+ .

Foi desenvolvido no Centro de Engenharia Biomédica da Unicamp e apoio do Instituto Federal de São Paulo – Campus Campinas, um dispositivo portátil para o teste do suor baseado no método clássico de Gibson & Cooke [6]. O equipamento produz corrente contínua constante e corrente contínua pulsada, selecionável, variando em torno de um ponto ajustável de corrente com frequências selecionáveis entre 0 e 5000 Hz.

O objetivo desse trabalho foi comparar a produção de suor e o tempo ideal de estimulação e coleta com o uso de corrente contínua pulsada (CCP) e corrente contínua constante (CCC) em indivíduos saudáveis.

Materiais e Métodos

Foram incluídos no estudo 48 indivíduos adultos, saudáveis, com idade média de $29,5 \pm 8,8$ (média \pm desvio padrão) sendo 79,2% mulheres. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em cada voluntário foram realizados dois testes, um em cada antebraço, totalizando 96 medições, sendo 48 referentes ao experimento 1 e 48 ao experimento 2. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sob o número #80430/2012. O TSC foi realizado com o auxílio do equipamento mencionado na introdução. Todos os testes foram realizados com forma de onda triangular. A Figura 1 ilustra o equipamento utilizado. Em todos os experimentos foram utilizados dois eletrodos iguais (catodo e anodo) com 3 cm de diâmetro construídos em latão (70/30).



Figura 1 – Fotografia do equipamento utilizado nos procedimentos de estimulação.

Experimento 1 – braço direito – Os testes foram realizados com tempo de estimulação de 10 min e de coleta do suor de 30 min. Foram aplicadas correntes de 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mA e frequências de 0 (CCC), 200, 1000 e 5000 Hz (CCP), totalizando 16 possíveis combinações de frequência e corrente. Cada teste foi feito por sorteio e foi realizado da seguinte forma: foi colocado em um recipiente 3 vezes o número de combinações possíveis, isto é, 48 etiquetas com números variando de 1 a 16. No recipiente havia 3 repetições de cada número (3x nº 1, 3x nº 2,..... 3x nº16), fazendo com que cada possível combinação fosse obrigatoriamente sorteada três vezes (três repetições). O voluntário retirava um número e esse estava associado a uma única combinação de corrente e frequência. Por exemplo: se fosse sorteado o número 6, o teste naquele voluntário seria com corrente de 0,5 mA e frequência de 200 Hz. Se fosse sorteado o número 15, o teste seria, naquele voluntário, com corrente de 1,0 mA e frequência de 5000 Hz.

Experimento 2 – braço esquerdo – Os testes foram realizados com corrente fixa de 1mA. A corrente foi aplicada no antebraço esquerdo com períodos de estimulação e coleta com: 5x15; 5x30; 10x10 e 10x30 minutos com frequências de 0; 200; 1000 e 5000 Hz. A escolha do teste foi por sorteio, como no experimento 1, só que as combinações foram os conjuntos de tempo combinados com as frequências.

Realização do teste do suor clássico – Em todos os experimentos os procedimentos de estimulação x coleta foram os mesmos e descritos a seguir.

Estimulação – O procedimento de estimulação inicia-se com a limpeza da pele do antebraço com água destilada e secagem com gaze estéril. Antes da fixação dos eletrodos foi medida a temperatura da pele com o auxílio de um termômetro infravermelho digital (Karknee Thermometer®, modelo DT8806C) no eletrodo positivo. A medida foi repetida após estimulação.

Os eletrodos foram fixados por meio de presilhas, sobre a gaze embebida em 4 ml de solução de pilocarpina 0,5% (eletrodo positivo) e ácido sulfúrico 0,004N (eletrodo negativo). Foi adotada distância de cinco centímetros entre os eletrodos. A Figura 2 ilustra a posição dos eletrodos.

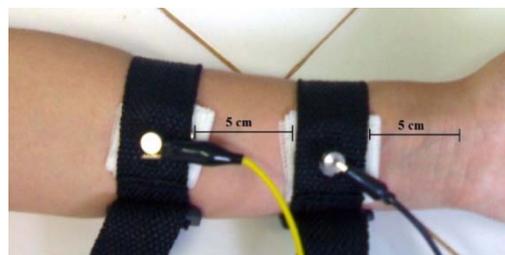


Figura 2 – Fotografia da posição dos eletrodos no antebraço de voluntário para o teste de suor. Eletrodo positivo fixado à esquerda e eletrodo negativo fixado à direita.

Coleta - Ao término da estimulação e retirada dos eletrodos, a pele foi limpa com água destilada e seca com gaze estéril. Após a limpeza foram colocados dois papéis de filtro com aproximadamente 17,5 cm², anteriormente pesados em conjunto com frasco de vidro e tampa em balança analítica digital (Modelo OD. AUY-220 220GX0.0001, Ref. AUY-220, Shimadzu®). Foram então cobertos com plástico e atadura de crepe. A Figura 3 ilustra o posicionamento do papel filtro.

Após o tempo pré-estabelecido para a coleta, os papéis filtro foram retirados com uma pinça e colocados novamente no frasco de vidro com tampa, pesado novamente e então calculado o peso de suor.



Figura 3 – Fotografia da fixação do papel filtro e filme plástico no local do estímulo para absorção do suor.

Análise estatística - Foi utilizada ANOVA Fatorial a x b com três repetições, sendo no experimento 1 os fatores: corrente x frequência. No experimento 2, foram considerados os fatores: tempo de estimulação x coleta e frequência. Foi considerado nível de significância de 0,05.

Resultados

Experimento 1 – A Figura 4 mostra a média dos pesos de suor de três voluntários para cada combinação: 0,5mA, 0,75mA, 1,0mA, 1,5mA em combinação com CCC, 200Hz, 1000Hz e 5000Hz. Como cada barra representa a média do peso de suor de 3 voluntários, tem-se 4 grupos (0, 200, 1000, 5000 Hz) associados a cada corrente, totalizando 48 medições no braço direito dos voluntários.

Os resultados dos testes ANOVA a x b com três repetições mostraram que houve diferença do peso do suor com a frequência de estímulo ($p=0,0168$) e com a corrente utilizada para a obtenção de suor ($p=0,0123$). Para corrente de 1mA o maior peso foi obtido com frequência de 1000 Hz. Não houve interação da frequência e corrente no peso do suor ($p=0,75$).

Experimento 2 - A Figura 5 mostra a média dos pesos de suor de três voluntários para os tempos de estimulação x coleta de 10x30; 10x15; 5x30; 5x15 minutos, em combinação com CCC, 200Hz, 1000Hz e 5000Hz.

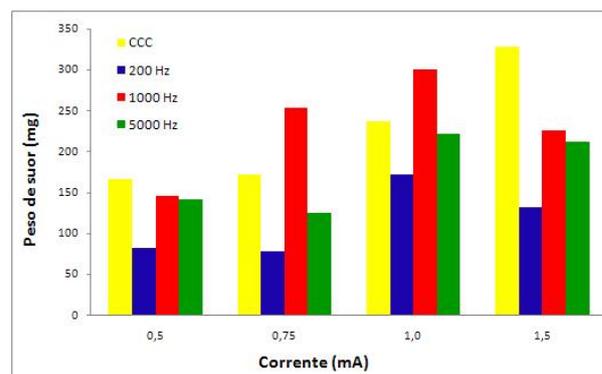


Figura 4 – Gráfico do peso médio de suor dos voluntários submetidos ao TSC em função das combinações de corrente e frequência.

A comparação entre os tratamentos (tempos para estimulação x tempos para coleta) mostrou diferenças entre os grupos ($p=0,0023$) e a comparação entre os blocos (frequências) não mostraram diferenças ($p=0,725$) e não houve interação entre o tempo de estimulação x coleta com a frequência ($p=0,59$). A influência nos tempos de estimulação x coleta foi a responsável pelo aumento do peso do suor e a frequência não teve influência observável. A comparação do peso do suor dos voluntários agrupados com os tempos de estimulação x coleta, independente da frequência, mostrou que o peso de suor foi maior com o grupo com tempo de estimulação de 10 min e coleta de 30 min ($p < 0,05$), comparado com os demais tempos.

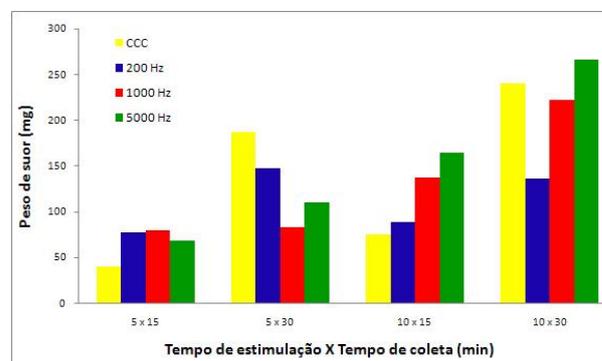


Figura 5 – Gráfico do peso médio de suor dos voluntários submetidos ao TSC em função das combinações de Tempo de estimulação x Tempo de coleta e frequências.

Discussão

O TSC é o padrão ouro para o diagnóstico da FC [8,9]. O Brasil não possui diretrizes próprias para realização do TSC e muitos centros e laboratórios nacionais não seguem os *guidelines* internacionais. Os centros brasileiros possuem equipamentos de indução de suor que são, na maioria, fabricados pelos centros universitários de referência em FC como equipamentos para pesquisa e não possuem autorização da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) [6,7].

Estudos internacionais relatam dificuldades na realização do TSC, principalmente devido à falta de padronização do mesmo em diferentes centros de referência e laboratórios de diagnóstico para a FC [10,11].

O uso da CCC pode resultar em polarização permanente da pele durante a estimulação, devido ao efeito capacitivo do conjunto eletrodo-gaze-pele, e reduzir a eficiência da administração iontoforética, proporcional ao tempo de aplicação da corrente, pelo aumento da impedância do conjunto. A acumulação desta corrente polarizada pode ser minimizada pela utilização da CCP [12].

Durante a fase sem estímulo, a pele fica polarizada e depois retorna ao estado inicial após estimulação. No entanto, Bagniefski e Burnett mostraram que maior despolarização da pele pode diminuir a eficiência do transporte de drogas se a frequência de CCP for alta [13].

No presente estudo, a frequência de 1000 Hz associada à corrente de 1mA e a CCC associada a 1,5 mA resultaram no maior peso de suor comparado com as demais. Quando comparamos as médias dos pesos de suor considerando todas as correntes dentro das frequências, os resultados mostram maior peso de suor na frequência de 1000 Hz, mas sem significância estatística ($p > 0,05$). É importante ressaltar que o uso de correntes mais baixas diminui a possibilidade de queimaduras e possível desconforto durante a iontoforese, principalmente quando aplicada em recém nascidos que possuem a pele mais sensível. O uso da CCP em nosso estudo foi feito com onda triangular e a quantidade de carga entregue foi bem menor quando comparada com CCC. Isso indica melhor eficiência de entrega da pilocarpina com CCP para indução do suor para a realização do TSC.

Outro ponto a ser considerado foi a grande dispersão dos valores medidos de peso de suor entre os voluntários dentro das mesmas condições de teste com coeficientes de variação de 45,7; 45,4; 53,3 e 36,2% para CCC; 200; 1000 e 5000Hz respectivamente. É entendimento dos autores que a frequência aplicada pode ter influência diferente em cada voluntário dependente do estado atual da pele, tais como: hidratação, umidade relativa do ar e fixação dos eletrodos. Testes com maior número de voluntários deveriam ser realizados para entender melhor essas relações.

O transporte de drogas por iontoforese depende, entre outras variáveis, da duração da corrente aplicada. Os consensos recentes sobre o TSC sugerem que o tempo de 5 min de estimulação seria o ideal para a estimulação da sudorese [14]. No nosso estudo, o tempo de estimulação de 10min para a indução de suor acima de 75mg foi melhor do que quando o indivíduo foi estimulado por apenas cinco minutos. Esse resultado está de acordo com o primeiro estudo da indução de suor por iontoforese realizado por Gibson & Cooke [4].

Conclusão

A realização do TSC com CCP resultou em maior peso de suor utilizando frequências de 1000 Hz e CCC ($p=0,0123$) e com correntes de 1,0 e 1,5 mA. O tempo para estimulação de 10 minutos associado ao tempo de coleta de 30 minutos resultou no maior peso de suor. Os autores recomendam que o TSC seja aplicado com corrente de 1 mA e frequência de 1000Hz com tempo de estimulação de 10 minutos e tempo de coleta de suor de 30 minutos.

Referências

- [1] Riordan, JR, Rommens, JM, Kerem, B, Alon, N, Rozmahel, R, Grzelczak, Z. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989; 245(4922):1066-73.
- [2] Dalcin, PTR, Rampon, G, Pasin, LR, Ramon, GM, Abrahão, CLO, Oliveira, VZ. Adherence to treatment in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(6):663-70.
- [3] Ribeiro, JD, Ribeiro, MA, Ribeiro, AF. Controversies in cystic fibrosis: from pediatrician to specialist. *J Pediatr*. 2002; 78(2):171-86.
- [4] Gibson, LE, Cooke, RE. A Test for Concentration of Electrolytes in Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas Utilizing Pilocarpine by Iontophoresis. *Pediatrics*. 1959; 23(3):545-9.
- [5] LeGrys, VA, Yankaskas, JR, Quittell, LM, Marshall, BC, Mogayzel, PJ Jr. Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic Sweat Testing: the Cystic Fibrosis Foundation Guidelines. *J Pediatr*. 2007; 151:85-9.
- [6] Vieira Junior, FU, Canavezi, PJC, Dissério Filho, Z, Costa, ET. Dispositivo estimulador de sudorese pelo método de iontoforese: projeto, construção e testes preliminares. In: Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica (CBEB), 2012, 01-05 Outubro, Ipojuca, Brasil, p. 1396-1400.
- [7] Servidone, MFCP. Métodos diagnósticos para a fibrose cística: clínico, genético e eletrofisiologia [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2014.
- [8] Farrell, PM, Rosenstein, BJ, White, TB, Accurso, FJ, Castellani, C, Cutting, GR, Durie, PR, Legrys, VA, Massie, J, Parad, RB, Rock, MJ, Campbell, PW. Cystic Fibrosis Foundation: Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults. In: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*. 2008; 153:S4e14.
- [9] Quinton, PM. Cystic fibrosis: lesson from the sweat gland. *Physiology (Bethesda)*. 2007; 22:212-225.
- [10] Mackay, R, George, P, Kirk, J. Sweat testing for cystic fibrosis: A review of New Zealand laboratories. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2006; 42:160-164.
- [11] Cirilli, N, Podan, R, Raia, V. Audit of sweat testing: A first report from Italian cystic fibrosis centres. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008; 7:415-422.
- [12] Panzade, P, Heda, A, Puranik, P, Patni, M, Mogal, V. Enhanced Transdermal Delivery of Granisetron by Using Iontophoresis. *IJPR*. 2012; 11:503-512.
- [13] Bagniefski, T, Burnette, RR. A comparison of pulsed and continuous current iontophoresis. *J. Controlled Release*. 1990; 11:113-22.
- [14] Castellani, C, Southern, KW, Brownlee, K, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal Cystic Fibrosis*. 2009; 8:153-173.