

DANIELA TENÓRIO FURGERI

**HAPLÓTIPOS DA REGIÃO GÊNICA CFTR
EM NÚCLEOS FAMILIARES DE PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA**

CAMPINAS

Unicamp

2008

DANIELA TENÓRIO FURGERI

**HAPLÓTIPOS DA REGIÃO GÊNICA CFTR
EM NÚCLEOS FAMILIARES DE PACIENTES
COM FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F976h Furgeri, Daniela Tenório
Haplótipos da Região Gênica CFTR em núcleos familiares de
pacientes com fibrose cística / Daniela Tenório Furgeri. Campinas, SP
: [s.n.], 2008.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Polimorfismo. 3. Haplótipo. 4.
Diagnóstico. 5. Genética. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Haplotypes of CFTR genic region in familiar nuclei of
patients with cystic fibrosis**

Keywords: • Cystic fibrosis
• Polymorphisms
• Haplotype
• Diagnosis
• Genetics

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro
Profa. Dra. Mithitaka Soma**

Data da defesa: 28 - 01 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

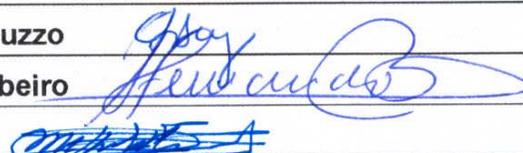
A handwritten signature in blue ink, appearing to be "C. Bertuzzo", is written over the name of the supervisor.

Membros:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

Prof. Dr. Mithitaka Soma

Three handwritten signatures in blue ink are written over the names of the examiners. The first signature is "C. Bertuzzo", the second is "A. F. Ribeiro", and the third is "M. Soma".

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cácio e Maria do Carmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, aos meus pais, Cácio e Maria do Carmo, pelas oportunidades concedidas e sólida formação que me proporcionaram a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado.

Ao meu irmão Juliano, pelo carinho e exemplo de calma e paciência.

À minha irmã Renata, pela amizade, compreensão e ajuda com as imagens.

Agradeço à minha avó Aracy, a primeira mestra da minha vida, pelo carinho, apoio, por sempre estar presente nos momentos mais importantes, mostrando-nos a importância da dedicação aos estudos e sempre vendo o lado positivo de todas as situações.

Ao meu tio Alfredo, pelo carinho, torcida e entusiasmo a cada passo dado.

Ao meu namorado, Rodrigo, pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e ajuda a esta dissertação.

Sou muito grata a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Bertuzzo, minha orientadora, pela humildade, amizade, entusiasmo e confiança, aceitando-me como estagiária em 2004 e aluna de mestrado em 2005.

Às minhas amigas Elisângela e Isabel, pelo acolhimento, experiência, ensinamento, amizade e ótima convivência de que sinto muita falta.

Ao meu amigo Renato, pelas risadas e por sempre estar disposto a ajudar.

Às minhas amigas Luciana e Cyntia, pelos bons momentos e 'co-orientação'.

Agradeço às minhas amigas Estela e Lidiane pelo carinho, amizade, confiança, companheirismo e por tornarem os momentos difíceis mais fáceis.

A todos meus colegas do laboratório, pelo respeito, alegria e agradável convivência, pessoas sempre cheias de energia e atitude positiva.

A todo o pessoal do Ambulatório de Fibrose Cística (docentes, residentes, pós-graduandos, estagiários), pela companhia, ajuda e boa convivência.

Ao Julio, pela amizade e por sempre disposto a fazer mais uma coleta.

Aos Professores Dr. José Dirceu Ribeiro e Dr. Antônio Fernando Ribeiro, pelas participações nas fases deste mestrado, sempre dispostos a ajudar, o que com certeza contribuirá para ampliar a qualidade desta tese.

Ao Prof. Mithitaka Soma que, desde a graduação, esteve disposto a ajudar, mostrando seu amor à biologia e à genética, estimulando, assim, meu interesse pelo conhecimento.

Ao Wanderlei, secretário do departamento de farmacologia, pela simpatia, paciência e enorme prestatividade.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

O meu profundo e sincero agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

A todos os que me ajudaram chegar até aqui, obrigada.

*“Se eu sou o que eu sei, então dentro de mim
tem uma parte de cada um que me ensinou.”*

Roberto Caproni

	PÁG.
RESUMO	<i>xvii</i>
ABSTRACT	<i>xix</i>
1- INTRODUÇÃO	21
1.1- Histórico da Fibrose Cística	22
1.2- Epidemiologia	24
1.3- Genética da Fibrose Cística	26
1.3.1- Gene CFTR.....	26
1.3.2- Proteína CFTR.....	27
1.3.2.1- Funcionamento da Proteína CFTR.....	29
1.4- Manifestações Clínicas	30
1.4.1- Sistema Respiratório.....	31
1.4.2- Sistema Digestivo.....	32
1.4.3- Sistema Reprodutor.....	33
1.5- Mutações Associadas a Fibrose Cística	34
1.5.1- Classes de Mutações.....	37
1.6- Diagnóstico da Fibrose Cística	38
1.6.1- Teste do Suor.....	40
1.6.2- Dosagem de Tripsina Imunorreativa (TIR).....	41
1.6.3- Condutividade.....	42
1.6.4- Análise genética.....	42
1.6.4.1- Diagnóstico Genético Pré-Implantação.....	42

1.6.4.2- Diagnóstico Pré-Natal.....	43
1.6.4.2.1- Vilosidade Coriônica.....	44
1.6.4.2.2- Amniocentese.....	44
1.6.5- Diagnóstico Indireto Através de Polimorfismos Genéticos.....	45
1.6.5.1- Polimorfismo GATT.....	46
1.6.5.2- Polimorfismo MP6-D9.....	46
1.6.5.3- Polimorfismo TUB09.....	46
1.6.5.4- Polimorfismo TUB18.....	46
1.7- Prognóstico da Fibrose Cística.....	47
2- OBJETIVOS.....	49
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
3.1- Casuística.....	52
3.2- Métodos.....	52
3.2.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	52
3.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase.....	53
3.2.3- Digestão Enzimática.....	55
4- RESULTADOS.....	59
4.1- Caracterização da amostra.....	60
4.2- Polimorfismos.....	60
4.2.1- GATT.....	60
4.2.2- MP6-D9.....	61
4.2.3- TUB09.....	61
4.2.4- TUB18.....	62

4.3- Haplótipos.....	63
4.4- Origem Parental.....	64
4.5- Uso para Diagnóstico Pré-natal e Pré-implantacional.....	65
5- DISCUSSÃO.....	66
6- CONCLUSÃO.....	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8- ANEXOS.....	85
Anexo 1- Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	86
Anexo 2- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AT	Adenosina trifosfato
C	Citosina
CBAVD	“Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens” – agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes
CFF	“Cystic Fibrosis Foundation” - Fundação para Fibrose Cística dos Estados Unidos
CFTR	“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”
DGPI	Diagnóstico Genético Pré-Implantação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EnaC	“Amiloride Sensitive Epithelial Sodium Channel”
FC	Fibrose Cística
G	Guanina
IP	Insuficiência Pancreática
Kb	Quilobase
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
mEq	Mili equivalentes
mg	Miligrama

mL	Mililitro
mM	Mili Molar
NBF	“Nucleotide-ATP-binding folds”
ORCC	“Outwardly Rectified Chloride Channels”
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
PKA	Proteína quinase A
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecinal sulfato de sódio
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STRP	Short Tandem Repeat Polymorphism
T	Timina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TIR	Tripsina imunorreativa
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
µg	Micrograma
µL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros (Raskin et al., 2001).....	24
Tabela 2- Estimativa da FC em alguns países (Bobadilla et al., 2002).....	25
Tabela 3 - Incidência de FC nos diversos grupos étnicos (Fitz-Simmons, 1993).....	25
Tabela 4- Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (Dawson e Frossard, 2000).....	36
Tabela 5- Descrição dos iniciadores utilizados na PCR dos polimorfismos, tamanho dos fragmentos resultantes desta reação.....	54
Tabela 6- Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para os polimorfismos.....	55
Tabela 7- Descrição das condições para realização da digestão enzimática.....	55
Tabela 8- Frequência alélica do polimorfismo GATT.....	60
Tabela 9- Relação da frequência alélica do polimorfismo GATT com o genótipo CFTR.....	60
Tabela 10- Frequência alélica do polimorfismo MP6-D9.....	61
Tabela 11- Relação da frequência alélica do polimorfismo MP6-D9 com o genótipo CFTR.....	61
Tabela 12- Frequência alélica do polimorfismo TUB09.....	62
Tabela 13- Relação da frequência alélica do polimorfismo TUB09 com o genótipo CFTR.....	62

Tabela 14-	Frequência alélica do polimorfismo TUB18.....	63
Tabela 15-	Relação da frequência alélica do polimorfismo TUB18 com o genótipo CFTR.....	63
Tabela 16-	Distribuição haplotípica dos pacientes com FC.....	64
Tabela 17-	Relação dos números de famílias nas quais os polimorfismos foram informativos.....	65
Tabela 18-	Número de famílias onde o haplótipo foi informativo para ser usado como diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.....	65

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Estrutura da proteína CFTR (adaptado de Rowntree e Harris, 2003).....	28
Figura 2- Funcionamento da proteína CFTR normal (parte superior) e alterada (parte inferior) nas glândulas sudoríparas (modificada de Tsui e Durie, 1997).....	29
Figura 3- Funcionamento da proteína CFTR alterada no pulmão (http://www.lclark.edu).....	30
Figura 4- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR (adaptado de Frizzell, 1995).....	34
Figura 5- Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no éxon 10 do cromossomo 7 (Adaptado de Welsh e Smith, 1995).....	35
Figura 6- Esquematização celular das 5 classes de mutações na FC.....	38
Figura 7- Localização do polimorfismo extragênico MP6-D9 e dos 3 polimorfismos intragênicos, GATT, TUB09 e TUB18 em relação ao gene CFTR.....	47
Figura 8- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% do polimorfismo GATT.....	56
Figura 9- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo MP6-D9.....	57
Figura 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo TUB09.....	57
Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo TUB18.....	58

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Critérios para o diagnóstico da FC (Rosensteins e Cutting, 1998).....	40

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética de padrão de herança autossômica recessiva com incidência de 1/2.500 indivíduos e uma frequência de portadores de 1/25 nos indivíduos caucasóides. A doença é progressiva e apresenta como manifestação clínica a obstrução respiratória crônica, infertilidade masculina e deficiência de ganho de peso pelo dano ao pâncreas exócrino. A maioria dos pacientes tem níveis elevados de eletrólitos no suor. O gene responsável pela doença foi localizado no cromossomo 7, possui 27 éxons e é denominado CFTR (“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene”). Existem mais de 1.000 mutações descritas em todo o gene, a mais freqüente, a $\Delta F508$, é caracterizada como uma deleção de três pares de bases, o que determina a perda de uma fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR, a qual forma um canal para o transporte do íon cloro. O defeito básico está associado com a diminuição da condução de íons cloro através da membrana apical de células epiteliais. O objetivo desse trabalho foi verificar em uma amostra de núcleos familiares de pacientes com fibrose cística, os haplótipos existentes, a possibilidade de utilização de polimorfismos para diagnóstico pré-natal e pré-implantação e correlacionar a mutação $\Delta F508$ com os haplótipos encontrados.

A análise de polimorfismos GATT foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise dos polimorfismos MP6-D9, TUB09 e TUB18 foi realizada através da PCR e digestão enzimática específica. Em nossa casuística, nove haplótipos diferentes foram encontrados em 39 cromossomos. Vinte e cinco estão ligados à mutação $\Delta F508$ e 14 ligados a outras mutações (não- $\Delta F508$). O haplótipo 6, +; G; C (GATT, MP6D9, TUB09 e TUB18) foi o mais freqüente (48%) em cromossomos com o gene CFTR alterado e está fortemente ligado à mutação $\Delta F508$ (64%). Em 43% das famílias analisadas pelo menos um polimorfismo informativo foi encontrado para o diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.

Em conclusão, estes polimorfismos constituem um excelente grupo de marcadores genéticos, úteis para observar a transmissão dos alelos mutados em famílias de pacientes com fibrose cística, onde não é possível estabelecer o genótipo completo. De acordo com os resultados obtidos, estes polimorfismos poderão ser amplamente utilizados para o diagnóstico pré-natal e pré-implantação, cumprindo com o objetivo do trabalho.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (FC) is a genetic autosomic recessive disease with an incidence of 1/2.500 life births and a carrier frequency of 1/25 in the caucasian population. The disease is progressive and present as a clinical manifestation the respiratory chronic blockage, male infertility and deficiency to gain weight caused for the damage to the exocrine pancreas. The majority of the patients has raised electrolyte levels in the sweat. The gene responsible is located in chromosome 7, and it has 27 éxons, and is called CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene"). Over 1.200 mutations have been described all over the gene and the mutation $\Delta F508$ is the most frequent, and is characterized as a deletion of three bases pairs, which determines the loss of a phenylalanine in position 508 of protein CFTR. The basic defect is associated with the reduction of the conduction of ions Cl^- through the apical membrane of epithelial cells. The CFTR forms a channel for the transport of this ion. The aim of this work was to determine to verify in a cystic sample of nuclei familiates of patients with cystic fibrosis, the existing haplotypes, the possibility of use polymorphisms for prenatal and preimplantacion diagnosis and to correlate the mutation $\Delta F508$ with the joined haplotypes. The analysis of polymorphism GATT was performed by polymerase chain reaction (PCR) and the analysis of polymorphisms MP6-D9, TUB09 and TUB18 polymorphism was performed by PCR and enzymatic digestion. In our casuistic, nine differents haplotypes had been found in 39 chromosomes. Twenty-five with $\Delta F508$ mutation and 14 with other mutations (not- $\Delta F508$), haplotype 6, +; G; C (GATT, MP6-D9, TUB09 and TUB18) was most frequent (48%) in chromosomes with mutated CFTR gene and is strong linked to the $\Delta F508$ mutation (64%). In 43% families analyzed at least an informative polymorphism were found for the prenatal diagnosis or preimplantacion. In conclusion, these polymorphisms constitute an excellent group of genetic useful markers to observe the transmission of the mutateds alleles in families of patients with cystic fibrosis, where it is not possible to establish the complete genotype. In accordance with the gotten results, these polymorphisms could be used for the prenatal and preimplantacion diagnosis, fulfilling with the objective of the work.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico da Fibrose Cística

As informações de fisiopatologia e epidemiologia da Fibrose Cística (FC) foram progressivamente conhecidos no século XX. A primeira menção quanto às características relevantes dos pacientes com FC está na própria denominação conferida pelo patologista Landsteiner em 1905 ao descrevê-la como “fibrose cística do pâncreas”, uma enfermidade do pâncreas exócrino, não envolvendo as ilhotas de Langherans. (Campos et al., 1996)

Landsteiner realizou a primeira descrição anatomopatológica da FC em recém-nascidos falecidos no quinto dia de vida por íleo meconial. Em 1936, Guido Fanconi e colaboradores descreveram o caso de uma criança com síndrome celíaca com alterações pancreáticas, diferentes da síndrome celíaca típica e que apresentava sintomas pulmonares e intestinais.

Em 1938, Dorothy Andersen formulou a hipótese da etiologia da doença, associou definitivamente as lesões pancreáticas às pulmonares, indicando o íleo meconial como manifestação mais precoce da doença. Assim, Andersen consolidou a FC como um entidade clínica, autônoma, multissistêmica, com uma incidência familiar significativa e propôs uma padronização de seu tratamento, tornando a doença conhecida nos países de língua inglesa. Esta publicação é considerada um marco no estudo da FC.

Posteriormente, Farber (1945) observou o caráter anormal espesso e viscoso das secreções mucosas das várias glândulas exócrinas e notou que os pacientes com FC sofriam de obstrução causada por esse muco em uma série de órgãos e propôs a hipótese de que o muco espesso era consequência de estímulo excessivo parassimpático e que a secreção acumulada, assim produzida, era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas. Farber conferiu a designação “mucoviscidose” à doença, enfatizando o bloqueio dos ductos pancreáticos e da árvore brônquica por esta secreção anômala (Campos et al., 1996)¹.

¹ Landsteiner (1905), Andersen (1938), Farber (1945) *apud* Campos JVM, Kotze LMS, Damaceno N, Carvalho CRR. Fibrose Cística – Mucoviscidose. São Paulo. IBEPEGE. Arquivos de Gastroenterologia; 1996, 48p.

Andersen e Hodges, em 1946, sugeriram o padrão de herança autossômico recessivo da doença. Um passo essencial para o diagnóstico foi dado por Di Sant'Agnesse et al. (1953) que demonstraram o teor anormalmente elevado do íon cloreto no suor, durante uma onda de calor no verão. Subseqüentemente, tais pesquisadores documentaram que os níveis de sódio e cloro no suor são elevados em todos os indivíduos com FC.

Em 1970, Campos e Szterling registraram grandes avanços sobre a estrutura das membranas celulares, com enfoque na dinâmica do transporte de íons por canais bioquímicos e na presença de permeases ou proteínas na estrutura bilipídica da membrana apical. Na revisão realizada por Campos e Szterling foi chamada a atenção para a hipótese de Johansen e colaboradores sobre as bombas celulares de íons cloreto e sódio na FC (Campos et al., 1996; Streit et al., 2003)².

Dois conjuntos de observações no início da década de 80 foram importantes para o rápido entendimento do defeito molecular ligado à FC. Primeiramente, Knowles et al. (1981) descreveram alterações nas propriedades elétricas do epitélio respiratório na FC, associadas a anormalidades no transporte de sódio e cloro. A seguir, Quinton e Bijman (1983) descobriram o defeito do íon cloro nas células epiteliais das glândulas sudoríparas dos pacientes fibrocísticos. Registraram altos potenciais bioelétricos em nível da membrana devidos ao decréscimo da absorção do íon cloreto nas glândulas sudoríparas dos pacientes com FC. Essas observações determinaram um papel patogênico para o movimento de água e eletrólitos pelo epitélio e, pela primeira vez, ofereceram explicação plausível tanto para o déficit de água nas secreções mucosas (responsável pela obstrução de glândulas exócrinas), quanto para a disfunção de múltiplos órgãos (Faria, 2007)

Em 1985, surge a primeira indicação da presença do gene da FC no cromossomo 7 (Wainwright et al., 1985). Em 1989, foi descoberto o gene que, quando mutado, causava a FC e o defeito na proteína produzida pelo gene CFTR. Com base em pesquisas realizadas pelo mapeamento genético, o gene responsável pela FC foi clonado

² Campos e Szterling (1970) *apud* Campos JVM, Kotze LMS, Damaceno N, Carvalho CRR. Fibrose Cística – Mucoviscidose. São Paulo. IBEPEGE. Arquivos de Gastroenterologia; 1996, 48p; Streit C, Bulamarque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene: molecular analysis in patients from south brazil. Mol Genet And Met 2003; 78:259-64.

(Rommens, 1989; Riordan, 1989; Kerem et al., 1989). Logo tornou-se claro que seu produto, a proteína CFTR era de fato um canal de cloro defeituoso localizado na membrana apical do epitélio (Bear et al., 1992).

1.2- Epidemiologia

A FC ou mucoviscidose é a doença genética autossômica recessiva mais freqüente na população de origem caucasóide, com freqüência estimada em um caso a cada 2500 nascimentos (Rommens et al., 1989). Atualmente existem mais de 70.000 indivíduos afetados no mundo (www.cff.org - 20 de outubro de 2007) e sua freqüência varia conforme o grupo étnico em que está presente (Kerem et al., 1989).

Sua incidência é de aproximadamente 1:3000 nascimentos vivos na Europa. Nos Estados Unidos a incidência é de 1:3500 e, no Brasil, a incidência na região sul assemelha-se a da população caucasiana do centro da Europa. Porém em outras regiões do país diminui para 1 em cada 10.000 nascidos vivos (Tabela 1) (Assael et al., 2002; Davis et al., 1996; Raskin et al., 1993; Ribeiro et al., 2002).

Tabela 1- Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros (Raskin et al., 2001).

Estado	Estimativa de incidência	Estimativa de portadores do gene da FC
RS	1: 1.587	01:20
PR	1: 6.803	01:42
SP	1: 7.358	01:43
SC	1:12.048	01:56
MG	1:20.408	1:72

A FC varia conforme a população (Tabela 2) e a origem étnica (Tabela 3), é relativamente rara em populações negras e a prevalência entre os afro-americanos é de 1/17.000 (Jorde et al., 2000), enquanto que entre os negros africanos é encontrada com uma incidência estimada em 1 em cada 12.000 nascidos vivos (Feuillet-Fieux et al., 2004).

Tabela 2- Estimativa da FC em alguns países (Bobadilla et al., 2002).

País	Estimativa de Incidência	Estimativa de portadores do gene da FC
Japão	1:100.000	1:158
Finlândia	1:25.000	1:79
Suécia	1:8.000	1:45
Suíça	1:7.700	1:44
Brasil	1:6.902	1:42
Noruega	1:4.500	1:36
Espanha	1:3.500	1:30
Alemanha	1:3.300	1:29
EUA	1:2.500	1:25
Itália	1:2.500	1:25

Tabela 3- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos (Fitz-Simmons, 1993).

População/Origem	Incidência
Europeus	1:936
Povos Hispânicos	1:1.800
Índio Norte Americano	1:2.350
Negros Americanos	1:17.000
Africanos	1:12.000
Asiáticos	1:90.000
Orientes do Havai	1:2.500

A FC está associada a uma morbidade e mortalidade em jovens adultos (Welsh et al., 2001). Os fibrocísticos apresentam um tempo médio de vida de 28 anos (Accurso e Sontag, 2003).

1.3- Genética da Fibrose Cística

1.3.1- Gene CFTR

Em 1985, encontrou-se ligação genética entre a enzima paraoxonase e a FC (Eiberg et al. 1985). Entretanto, a localização cromossômica do gene da paraoxonase não era bem conhecida. Nesse mesmo ano encontrou-se uma forte ligação genética entre a FC e um marcador polimórfico de localização desconhecida (DOCRI-917), posteriormente localizado no cromossomo 7 (Knowlton et al., 1995).

A análise de ligação, utilizando um grande número de marcadores polimórficos de DNA, reduziram a possível região para o locus do gene da FC a cerca de 700 Kb. Foi localizado, então, o gene da FC no braço longo do cromossomo 7, na região q31.2 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989).

Já que não foi encontrada nenhuma anomalia cromossômica estrutural, a clonagem posicional foi à técnica de escolha para a descoberta do gene responsável pela FC. Uma região do DNA de 250 Kb foi isolada através de uma série de experimentos de clonagem molecular que se basearam no isolamento de pequenos segmentos da região de interesse. Estes fragmentos foram purificados e testados para a presença de seqüências codificadoras (Rommens et al., 1989; Welsh et al., 2001).

Análises de seqüências de DNA e estudos comparativos de seqüências deduzidas de aminoácidos revelam diversas homologias com proteínas de membrana celular. Daí a adoção do termo "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR) para o produto gênico (Riordan, 1989). A prova final da identidade e função do gene da FC foi obtida pela capacidade de restaurar o fenótipo normal em células com FC transformadas em cultura (Rich et al., 1990).

Embora os marcadores mais próximos estivessem a certa distância do gene responsável pela doença, ficou claro que 90% dos cromossomos tinham um haplótipo particular (Thompson et al., 2002). Este resultado é conhecido como desequilíbrio de ligação, que é definido como a associação preferencial de um gene de doença com marcadores próximos.

Reconhecida como uma doença autossômica recessiva em 1930, a FC tem sido considerada uma doença monogênica.

O locus específico do gene CFTR contém aproximadamente 250 quilobases de DNA genômico, organizados em 27 éxons, que codificam um RNA mensageiro de 6,5 quilobases (Kb) (Collins, 1992).

1.3.2- Proteína CFTR

O RNA mensageiro é traduzido, a partir do gene da FC, em uma proteína transmembrana de 1480 aminoácidos, com massa molecular de 168.138 dáltons, da família das proteínas ATP reguladora de transporte de íons denominada Proteína Reguladora da Condutância Iônica Transmembrana (CFTR – “Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”) (Devlin, 1998).

A proteína CFTR é expressa na superfície de células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, fígado, intestino, aparelho reprodutor, glândulas salivares e sudoríparas, formando um canal de cloro (Anderson et al., 1991).

A proteína CFTR está envolvida na regulação do ORCCs (“Outwardly Rectified Chloride Channels”), que contribuem para uma boa condução do íon cloro pelas células, e do EnaC (“Amiloride-Sensitive Epithelial Sodium Channel”) que controla a passagem do íon sódio. Sua estrutura básica está representada na figura 1 e é formada por três subunidades principais : uma porção hidrofóbica, outra hidrofílica e uma porção polar. A região hidrofóbica é formada por seis segmentos capazes de atravessar a camada lipídica dupla da membrana celular; a porção hidrofílica contém duas dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP (“nucleotide-ATP-binding folds”- NBF's), e finalmente, o domínio polar R com sítios potenciais para fosforilação pelas proteínas quinase A e C e N-glicosilase (Riordan, 1989; Devlin, 1998).

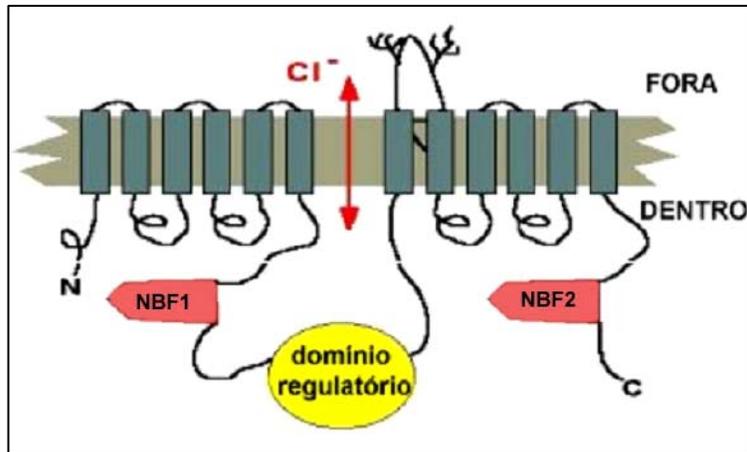


Figura 1- Estrutura da proteína CFTR (adaptado de Rowntree e Harris, 2003).

A seqüência de ativação dos canais de Cl dá-se do seguinte modo: a proteína quinase A (PKA) fosforila sítios no domínio regulatório da proteína, produzindo um canal fechado, cuja abertura requer a ligação de MgATP a um ou aos dois domínios de ligação a nucleotídeos. A ligação do MgATP coloca o canal em um novo estado conformacional, podendo agora abrir espontaneamente. A reação inicial de fosforilação é reversível através de fosfatases (Frizzell, 1995).

Os domínios membranares formam o poro da proteína, ou seja, constituem o canal propriamente dito. Mutações nesses domínios alteram a seletividade iônica do canal (Welsh e Smith, 1993). Já os domínios de ligação a ATP, controlam a atividade do canal pela hidrólise da ATP promovida pela fosforilação do domínio regulador. Cada domínio NBF possui uma função. O primeiro, NBF1, que é codificado pelas seqüências encontradas nos éxons 9 ao 12, é responsável pela abertura do canal, enquanto o segundo, NBF2, codificado pelas seqüências encontradas desde o éxon 19 ao 23, é responsável pelo fechamento deste (Zielenski e Tsui, 1995; Welsh e Smith, 1993).

In vitro, após ser traduzida, a CFTR segue para o retículo endoplasmático onde sofre a glicosilação e depois segue para o complexo de golgi onde ocorre o dobramento, adquirindo sua forma madura. Após este processo que é chamado de maturação, a CFTR é enviada para a membrana celular onde irá atuar como canal de cloro.

1.3.2.1- Funcionamento da Proteína CFTR

O defeito básico da FC está associado com a diminuição da condução de íons Cl através da membrana apical de células epiteliais. Indivíduos afetados por FC possuem um comprometimento do transporte de cloreto. As conseqüências da perda de função da proteína CFTR variam de acordo com os tecidos envolvidos. Nas glândulas sudoríparas, a CFTR normal funciona reabsorvendo o cloro do lúmen da glândula. Quando defeituosa, o cloro deixa de ser reabsorvido ficando em concentrações elevadas no lúmen. Como a CFTR também regula ORCC e EnaC (Devlin, 1998), quando está defeituosa, o cloro não é reabsorvido, já que o ORCC se torna inativo e o sódio, devido à hiperatividade do EnaC, é hipersecretado fazendo com que o cloro e o sódio sejam encontrados em concentrações elevadas no suor, levando ao conhecido ‘suor salgado’ desses pacientes (Figura 2).

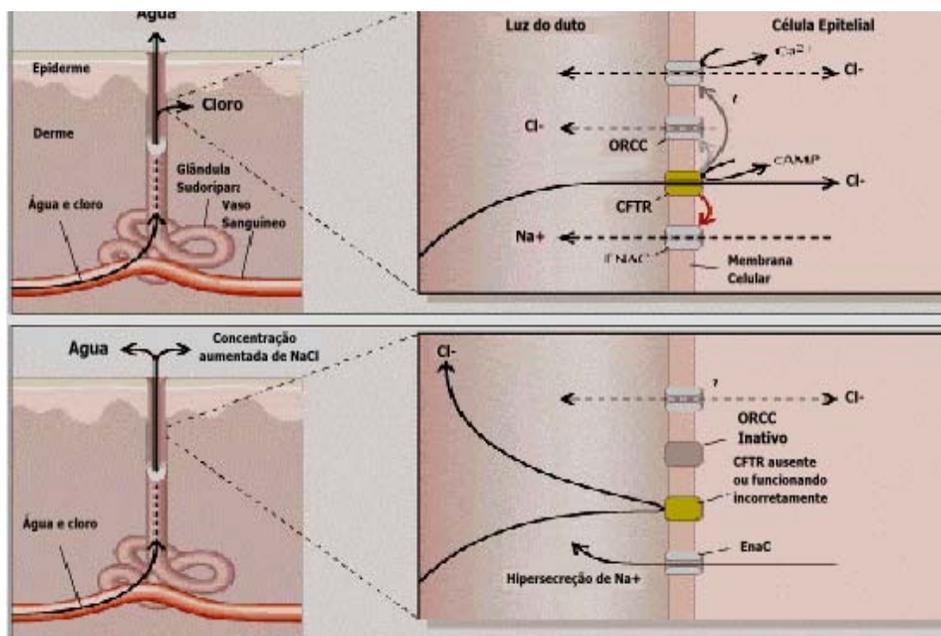


Figura 2- Funcionamento da proteína CFTR normal (parte superior) e alterada (parte inferior) nas glândulas sudoríparas (modificada de Tsui e Durie, 1997).

Já em outros órgãos, como o pulmão e o pâncreas, a CFTR normal atua secretando o cloro (Figura 3) e não o reabsorvendo como ocorre nas glândulas sudoríparas (Hull, 2003). Portanto, o funcionamento da CFTR defeituosa, provoca um acúmulo do íon

cloro dentro da célula, causando aumento do fluxo de sódio através dos canais de sódio (EnaC), com o objetivo de manter o equilíbrio eletroquímico interno da célula (Reis e Damaceno, 1998).

A combinação da diminuição da secreção do íon cloro, pela ausência ou mau funcionamento da CFTR, e do aumento da reabsorção de sódio e água, através do EnaC, resulta na diminuição do líquido de superfície das vias aéreas, conduzindo à desidratação das secreções respiratórias e ao aumento de sua viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos e infecções endobrônquicas (Ribeiro et al., 2002).



Figura 3- Funcionamento da proteína CFTR alterada no pulmão (<http://www.lclark.edu>)

1.4- Manifestações Clínicas

A FC é uma doença que possui uma expressividade altamente variável, ou seja, a gravidade da doença pode variar muito entre as pessoas que a possuem, assim como sua idade de início, que varia desde o período neonatal até a vida adulta, com alguns pacientes sendo assintomáticos por vários anos. É essencialmente uma doença pós-natal, com poucas manifestações clínicas ao nascimento, como íleo meconial, volvulus, atresia ou amputação intestinal, resultante da secreção intestinal anormal de muco. A gestação de crianças afetadas pela FC é de duração normal, sendo apenas o peso ao nascimento levemente reduzido (Boyer, 1955). Em geral, a doença não se manifesta antes do nascimento e mesmo naqueles casos em que alguma manifestação ocorre, o desenvolvimento do feto é normal.

O fenótipo da FC é complexo e os seus pacientes exibem uma grande variedade de sintomas respiratórios, gastrointestinais e no aparelho reprodutor, bem como níveis elevados de eletrólitos no suor (Tsui, 1995).

A proteína CFTR está envolvida na reabsorção do cloro a partir do suor nas glândulas sudoríparas (Quinton, 1990). A inibição dessa reabsorção e o efluxo compensatório de sódio resultante explicam o suor salgado da mucoviscidose (Boucher et al., 1986).

A maioria dos pacientes apresenta os sintomas no início da vida, apenas uma pequena parte deles manifesta os sintomas tardiamente, na adolescência ou na idade adulta (Anderson et al., 1992). As manifestações mais frequentes na época do diagnóstico foram descritas pela Cystic Fibrosis Foundation (CFF), 20 de outubro de 2007.

1.4.1- Sistema Respiratório

Problemas no sistema respiratório são responsáveis por mais de 90% da morbidade e mortalidade em pacientes com FC (Tebbutt et al., 1998), apresentando-se de forma progressiva e de intensidade variável (Alvarez, 2002). Esta intensidade de acometimento é que determina o prognóstico da doença. Ao nascimento, as crianças com FC apresentam pulmões estruturalmente normais mas, com o tempo, infecções e inflamações sucessivas culminam em hipertensão pulmonar e insuficiência respiratória crônica (Hodson, 2000).

Ao nascimento, o pulmão é histologicamente normal e as alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas. A lesão inicial é a dilatação e hipertrofia das glândulas secretoras de muco (Sturgess, 1982). Ocorre infiltração linfocitária aguda e crônica. Podem ocorrer pneumonias de repetição, principalmente em pacientes mais jovens (Bedrossian et al., 1976). Com a evolução formam-se bronquiectasias, por causa da incapacidade do indivíduo em esterilizar o trato respiratório e diminuir o processo inflamatório (Tomashefski et al., 1986).

Devido à ineficiência na eliminação do muco, os pulmões ficam altamente suscetíveis à infecção bacteriana. Os microorganismos mais comumente encontrados são: *Pseudomonas aeruginosa* em aproximadamente 80% dos pacientes com FC, o que resulta em perda progressiva da função pulmonar, levando à morte (Demko et al., 1995); *Staphylococcus aureus* (28,3%), *Haemophilus influenzae* (8,9%) e *Burkholderia cepacea* (3,2%) (Robinson, 2001); *Staphylococcus aureus* é o primeiro microorganismo a colonizar os pacientes, predispondo o organismo para a colonização pela *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). A bactéria mais comum, a *P. aeruginosa*, coloniza a maioria dos pacientes com FC antes dos 10 anos de idade. As cepas não-mucóides ocorrem no início da colonização que, ao tornar-se crônica, são substituídas por cepas mucóides. A colonização por essa bactéria é claramente a principal causa da doença pulmonar progressiva na maioria dos indivíduos. Já a bactéria *Burkholderia cepacia* aparece em uma fase mais tardia e constitui um problema terapêutico grave que evolui como uma infecção pulmonar fulminante, freqüentemente fatal, devido à elevada resistência natural deste microorganismo à grande maioria dos antibióticos conhecidos (Alvarez, 2002).

1.4.2- Sistema Digestivo

As manifestações clínicas relacionadas ao aparelho digestivo são variáveis. A mais importante e freqüente é a disfunção pancreática que, quando presente, pode ter início, na fase fetal, a insuficiência exócrina do pâncreas que segundo Maclusky e Levison (1990), ocorre ainda no período intra-uterino, quando há uma inflamação, com perda de função e fibrose do órgão. Cerca de 80 a 90% dos pacientes são acometidos apresentando grau variável e progressivo de comprometimento do órgão devido à obstrução dos ductos devido à presença das secreções densas e desenvolvimento gradual de fibrose no órgão (Salvatore et al., 2002). A causa dessa disfunção é a obstrução causada por secreções espessas e a subsequente destruição das glândulas exócrinas do pâncreas, que resultam em deficiência pancreática enzimática e desnutrição (Korst et al., 1995).

A apresentação clínica caracteriza-se por diarreia crônica, com evacuações de fezes volumosas e gordurosas, sendo percebidos restos alimentares (Reis e Damaceno, 1998). A desnutrição se instala rapidamente pela perda de calorías, vitaminas e proteínas

devido à má digestão alimentar, além do aumento das necessidades calóricas causado pelas infecções respiratórias de repetição que conduzem a um baixo ganho pômdero – estatural (Reis e Damaceno, 1998).

A mais importante das manifestações intestinais da FC é o íleo meconial, decorrente da obstrução do lúmen íliaco por massa meconial viscosa. O recém-nascido tem dificuldade de eliminar seu material gastrointestinal (mecônio), que acaba por bloquear o intestino. A obstrução intestinal com íleo meconial ocorre em 10 a 20% dos pacientes recém-nascidos (Anderson et al ., 1992).

Os sinais de obstrução intestinal podem aparecer dentro de 48 horas após o nascimento. Evans et al. demonstraram que pacientes com FC que tiveram íleo meconial apresentaram uma piora na prova de função pulmonar quando comparados a pacientes que não o tiveram e foram diagnosticados por triagem neonatal. Deste modo, esses autores sugerem que o íleo meconial esteja associado a um fenótipo mais grave da doença.

A síndrome da obstrução intestinal distal é equivalente ao íleo meconial que ocorre em adolescentes e adultos com FC e também ocorre em 10 a 20% dos casos (Alvarez, 2002). Esta é consequência do material muco-fecal apresentar uma viscosidade anormal no íleo terminal e no cólon direito, onde o bolo fecal é normalmente líquido, provocando grande dor abdominal com uma massa palpável na fossa íliaca direita, sendo que os sintomas são exacerbados após a alimentação.

1.4.3- Sistema Reprodutor

A infertilidade é um sintoma comum nos pacientes, principalmente nos homens, sendo que 98% dos homens com FC são estéreis.

Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (CBAVD – “Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens”) é uma doença autossômica recessiva relacionada à infertilidade que acomete homens saudáveis. Aproximadamente 6% dos casos de azoospermia são por CBAVD (Bernardino et al., 2003). Aproximadamente 75% dos

homens diagnosticados com CBAVD possuem mutações para a FC (Chillón et al., 1995). Em 98% dos homens fibrocísticos ocorre azoospermia devido à obstrução do canal deferente.

A CBAVD é caracterizada por atrofia, fibrose ou ausência do epidídimo, vaso deferente, vesícula seminal e ductos ejacatórios (Quinzii e Castellani, 2000). A patologia associada às alterações estruturais provavelmente está associada à obstrução do trato reprodutivo, devido ao muco espesso, no período intra-uterino (Kaplan et al., 1968).

Na maioria dos casos, a espermatogênese não está comprometida, porém as alterações obstrutivas não permitem que os espermatozoides cheguem à uretra. Nestes casos, a opção seria a fertilização assistida, levando em consideração a possibilidade de riscos de FC para a descendência do casal (Moutou et al., 2002).

Já a fertilidade diminuída das mulheres fibrocísticas, que ocorre em 60% das pacientes (Gilljam et al., 2000), está relacionada ao muco cervical espesso, que ainda possui características bioquímicas alteradas, agindo como um espermicida.

1.5- Mutações Associadas a Fibrose Cística

Existem mais de 1500 mutações, de diferentes tipos, relatadas no gene CFTR (www.genet.sickkids.on.ca/cftr) (Figura 4).

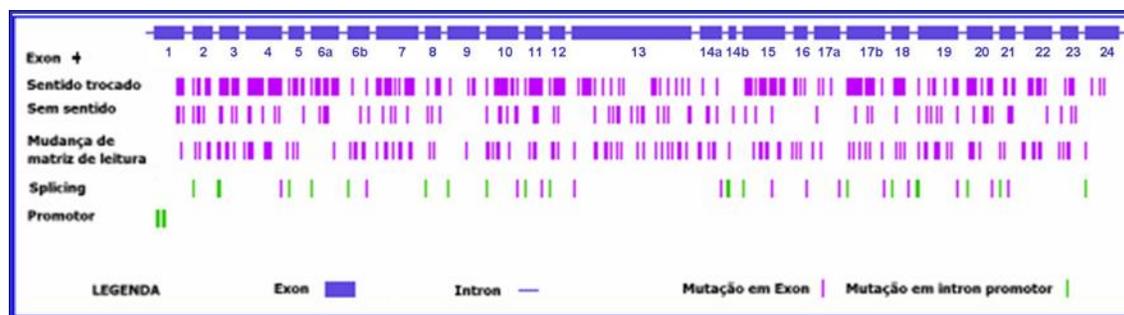


Figura 4- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR (adaptado de Frizzell, 1995).

No resíduo 508 da proteína, ocorre a mutação mais freqüente, a $\Delta F508$ (Figura 5), no éxon 10 do gene, que é caracterizada como uma deficiência de três pares de bases, a qual determina a perda de uma fenilalanina na proteína CFTR (Kerem et al., 1989). A mutação $\Delta F508$ ocorre em 70% dos fibrocísticos nos USA (Knowles, 2006).

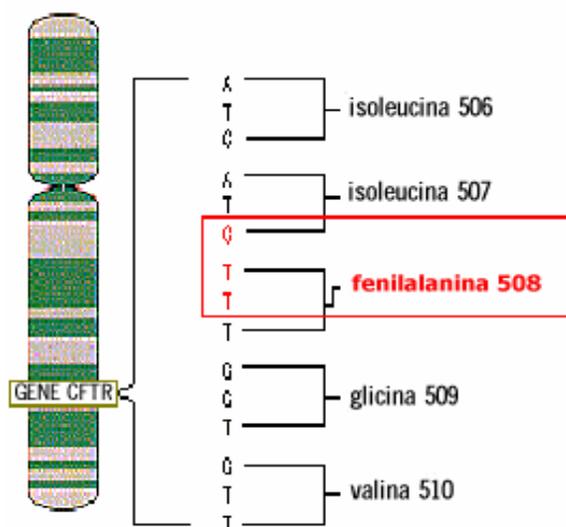


Figura 5- Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no éxon 10 do cromossomo 7 (Adaptado de Welsh e Smith, 1995).

A prevalência da mutação $\Delta F508$ varia de acordo com a população estudada (Tabela 4). Assim, foram constatadas prevalências de 80% na Inglaterra, 70% na América do Norte (Chillon et al., 1993); 67% na França (Chomel et al., 1990), 50% na Espanha, 42% na região de Verona, na Itália, e 27% na Turquia (Chillon et al., 1993). Devido à importância dessa anomalia e a frequência elevada dessa mutação, foi realizado um esforço conjunto de pesquisadores visando o mapeamento dessa mutação no Continente Europeu (European Working Group, 1990). Apesar da frequência elevada da mutação $\Delta F508$, mais 1500 outras alterações gênicas foram descritas, a maioria localizada nos éxons 10 e 11 do cromossomo sete. Nenhuma delas atinge prevalência tão elevada quanto a mutação $\Delta F508$.

Tabela 4- Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (Dawson e Frossard, 2000).

País	Frequência da $\Delta F508$ (%)
Dinamarca	87
Reino Unido	75
Estados Unidos	70
França	68
Alemanha	68
Bulgária	66
Argentina	57
Espanha	54
Itália	52
Grécia	52
Brasil	47
Portugal	44
México	34
Cuba	34
Judeus Askenazi	30
Turquia	19
Istambul	19

As mutações que também teriam importância relativa devido à sua frequência seriam as G542X (C→A), G551D (G→A), R553X (C→T), que ocorrem no éxon 11 e N1303K (G→C) no éxon 21. Juntas, essas quatro mutações ocorreriam em cerca de 9% dos alelos fibrocísticos na população caucasóide norte-americana (Dork et al., 1991a).

No Brasil foi realizado um estudo inicial com 80 pacientes portadores de FC e foi verificado a presença das 5 mutações : $\Delta F508$, G542X, G551D, R553X e N1303K. Verificaram que as mutações juntas perfazem cerca de 40% dos alelos mucoviscidóticos (26,03% - $\Delta F508$; 6,85% - G542X; 2,74% - N1303K; 2,05% - G551D e 2,33% - R553X) (Parizotto, 1997).

1.5.1- Classes de Mutações

As mutações da FC foram classificadas em 5 diferentes classes (Figura 6), de acordo com o mecanismo através do qual a proteína CFTR alterada se apresenta (Welsh et al., 2001).

As classes I, II e III são classificadas como as de fenótipo mais severo, já que englobam mutações que levam à produção de pouca ou nenhuma proteína (Zielenski e Tsui, 1995) e invariavelmente a uma IP (Zielenski, 2000).

As mutações da classe I resultam em defeito ou ausência de síntese da proteína, causada pelas mutações de “splicing”, mudança de matriz de leitura ou sem sentido (Zielenski e Tsui, 1995). Entre as mutações mais frequentes desta classe encontra-se a mutação G542X, que produz um códon de parada da transcrição formando uma proteína truncada.

Nas mutações da classe II os defeitos ocorrem na maturação da proteína, impedindo que esta chegue à membrana, que seja processada e assuma sua conformação correta. Faz parte dessa classe a mutação mais frequente, a $\Delta F508$ (Welsh e Smith, 1993).

As mutações da classe III afetam o domínio regulatório, comprometendo a regulação do canal. Um exemplo dessa classe é a mutação G551D (Salvatore et al., 2002).

Mutações nas classes IV e V estão associadas à função residual do gene CFTR, e são geralmente associadas a uma função pancreática satisfatória (Koch et al., 2001; MCKone et al., 2003).

As mutações de classe IV produzem uma proteína que é corretamente localizada na membrana e responde à estimulação da ATP, porém gera uma menor condução de íons cloro e diminui o tempo de abertura do canal. Como exemplo, as mutações R117H e R347P.

As mutações de classe V altera a estabilidade da proteína e o processamento da CFTR é normal, porém em quantidade reduzida e pequenos níveis funcionais desta são alocados na membrana (Rowntree e Harris, 2003).

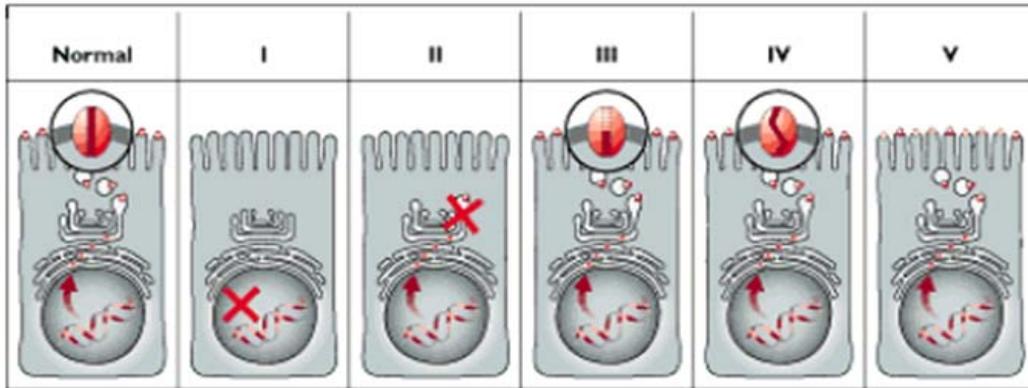


Figura 6- Esquematização celular das 5 classes de mutações na FC.

Classe I – não ocorre a síntese protéica; classe II - defeito na maturação e processamento da proteína; classe III - defeito na regulação do canal; classe IV - alteração na condução do canal; classe V- alteração na estabilidade da proteína (Welsh et al., 2001).

O número de classes foi estendido para seis (Vankeerberghen et al., 2002) e incorporada a classe VI, que promove alterações que afetam as propriedades de regulação da proteína CFTR. Como exemplo, a mutação A455E, localizada no éxon 9 do gene CFTR.

1.6- Diagnóstico da Fibrose Cística

O diagnóstico da FC nunca foi simples. É uma doença multissistêmica apresentando uma grande variabilidade de manifestações clínicas, com diferentes graus de acometimento e com início de manifestação variável. Apesar de manifestar-se por formas atípicas, a CFF, propôs algumas características fenotípicas, que devem nortear o diagnóstico da doença (embora os autores admitam que provavelmente não cubram todos os quadros clínicos possíveis), tais como:

- História familiar da doença;
- Anormalidades intestinais (síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal e íleo meconial, ocorrendo em cerca de 10% dos recém nascidos com FC) e pancreáticas (dificuldade de ganho de peso adequado durante a infância, embora demonstrando um apetite voraz, evacuações freqüentes de fezes gordurosas com forte odor);
- Doença pulmonar ou sinusal crônica, manifestada por colonização/infecção, alterações persistentes na radiografia do tórax (bronquectasias, atelectasias, opacificações e hiperinsuflação com obstrução das vias aéreas), tosse freqüente e repetitiva com produção de catarro, episódios de respiração difícil, retração dos tecidos moles nas áreas supraclaviculares, supraexternal, intercostais e subcostais (Campos et al., 1996; Correia, 2005);
- Teste positivo da triagem neonatal (dosagem da tripsina imunorreativa);
- Atresia do canal deferente, resultando em azoospermia obstrutiva.

Até 1930, a doença era reconhecida como uma síndrome clínica, mas as características não eram claramente distintas daquelas de outras causas de má absorção e retardo no crescimento, como a intolerância ao glúten (ou doença celíaca) (Andersen, 1938).

Para a grande maioria dos pacientes o diagnóstico é sugerido pela presença de uma ou mais características clínicas, história familiar de FC, ou resultado positivo de teste de triagem neonatal, o qual é confirmado por evidência laboratorial de disfunção do gene CFTR (Rosenstein e Cutting, 1998).

A FC clássica pode ser diagnosticada ou excluída pelo teste do suor. Para alguns pacientes com poucos sintomas presentes, no entanto, testes mais extensivos, como o molecular, são necessários para identificar variantes mais brandas. O diagnóstico da doença proporciona aconselhamento genético e vigilância pulmonar apropriada, o que pode se tornar cada vez mais importante à medida que os avanços terapêuticos melhoram o prognóstico (Stern, 1997). Critérios para o diagnóstico da FC estão relacionados no quadro 1.

Quadro 1- Critérios para o diagnóstico da FC (Rosensteins e Cutting, 1998).

Uma ou mais características fenotípicas

- ou história familiar de FC
- ou resultado de teste de triagem neonatal positivo E concentração aumentada de cloreto no suor por iontoforese com pilocarpina em duas ou mais ocasiões
- ou identificação de duas mutações no gene CFTR
- ou demonstração de transporte anormal de íons no epitélio nasal (diferença de potencial nasal)

1.6.1- Teste do Suor

O folclore suíço e austríaco já observava, em tempos medievais, que uma criança que tinha gosto salgado ao ser beijada era considerada enfeitiçada e morria precocemente. No entanto, somente em 1953, Paul di Sant’Agnese demonstrou o excesso de sal no suor de pacientes com FC (Wilcken e Wiley, 2003). Ainda hoje, na maioria dos casos, o diagnóstico de FC será confirmado pela medida da concentração de cloreto no suor (Rosenstein, 1998). O teste é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da FC, com elevadas sensibilidade e especificidade (>95%), baixo custo e a vantagem de não ser invasivo. Atualmente, o único método que permanece clinicamente confiável é o da iontoforese quantitativa por pilocarpina, padronizado por Gibson e Cooke, em 1959. O exame é realizado através da estimulação das glândulas sudoríparas pela aplicação da pilocarpina em área da pele do antebraço, com coleta de suor pela iontoforese (Alvarez, 2002). A quantidade de suor necessária é de no mínimo 100mg. O resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior que 60mEq/L. Valores menores que 45mEq/L são considerados normais; adolescentes e adultos jovens podem ter valores mais elevados e, desta forma, resultados entre 45 e 60 mEq/L são considerados duvidosos e o exame deve ser repetido. Resultados falso-positivos e falso-negativos são freqüentemente detectados (Wilmott, 1998).

Pela gravidade da doença e pelo seu prognóstico reservado, o diagnóstico de FC somente poderá ser firmado com dois testes positivos, realizados em momentos diferentes. Não existe correlação entre a concentração de íons no suor e a gravidade da doença (Ribeiro et al., 2002).

1.6.2- Dosagem de Tripsina Imunorreativa (TIR)

O exame mais utilizado para o diagnóstico da FC é a dosagem quantitativa da tripsina imunorreativa (TIR) por imunofluorimetria, que é baseado no aumento do tripsinogênio no sangue, secundário ao refluxo de secreção pancreática provocado pela obstrução dos ductos pancreáticos.

O teste deve ser realizado na primeira semana de vida, com amostras de sangue impregnadas em papel-filtro especial, como na coleta para pesquisa de fenilcetonúria e hipotireoidismo. A dosagem da TIR é um indicador indireto da FC, pois avalia apenas a integridade da função pancreática. Um teste com valores acima do padrão adotado, 70ng/mL, deverá ser repetido num intervalo de 15 a 30 dias e, se persistir positivo, o paciente deverá ser submetido ao teste do suor, para confirmar o diagnóstico de FC. Embora este teste tenha uma eficiência de 95,3%, segundo dados obtidos em um trabalho realizado na região de Victória na Austrália entre os anos de 1989 e 1998 (Massie et al., 2000), deve haver uma confirmação do resultado através do teste molecular ou teste do suor, pois há possibilidade de falsos positivos e/ou falsos negativos. Um teste negativo de TIR não exclui FC na ausência de insuficiência pancreática (Ribeiro, 2002).

Através de uma portaria, o Ministério da Saúde, tornou obrigatória a realização da triagem da FC como parte do ‘teste do pezinho ampliado’. Portanto, os médicos pediatras devem ser alertados sobre como interpretá-lo corretamente. Apesar disto, cerca de 3 milhões de crianças que nascem no Brasil todo ano, apenas 1,8 milhão têm acesso ao teste (www.genetika.com.br - 20 de agosto de 2007).

1.6.3- Condutividade

A condutividade é um método alternativo e não-seletivo para a medida de íons no suor, que estão aumentados em pacientes com FC e sua quantificação foi proposta como teste diagnóstico. A Fundação para Fibrose Cística dos Estados Unidos (“Cystic Fibrosis Foundation”) aprovou um condutímetro especialmente desenhado para uso com o coletor de suor Wescor Macroduct, como método de triagem. Há excelente correlação entre os resultados das concentrações de cloro e a condutividade no suor. Um resultado de condutividade igual ou superior a 50mmol/l é considerado positivo e deveria ser confirmado por um teste do suor quantitativo (Rosenstein, 1998).

1.6.4- Análise genética

O diagnóstico molecular da FC é muito útil para identificar precocemente pacientes e assim, dar início ao tratamento mais adequado, o mais rápido possível. Isto tem se mostrado significativo para uma melhora na qualidade de vida e, conseqüentemente, uma longevidade desses pacientes. Este fato não é uma realidade em países como Brasil em que a maioria dos casos permanecem, provavelmente, sem diagnóstico e, principalmente, pela existência de muitas famílias em situação socioeconômica não privilegiada. Além disso, o diagnóstico precoce tem suma importância para prevenção de muitas famílias “de risco” (Streit et al., 2003).

A identificação de duas mutações conhecidas confirma o diagnóstico de FC, sendo decisivo naquele paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor inconclusivo. A análise das mutações é de alto custo e poucos centros no Brasil estão capacitados a realizá-la. A triagem das 25 mutações mais freqüentes detecta 80 a 85% dos alelos de pacientes com FC. Dessa forma, a confirmação do diagnóstico pelo teste genético é extremamente específica, porém não muito sensível (Ribeiro et al., 2002).

1.6.4.1- Diagnóstico Genético Pré-Implantação

Para se evitar uma gestação de um feto doente, pode-se fazer um diagnóstico genético pré-implantação (DGPI). Para esse diagnóstico é utilizado técnicas de reprodução medicamente assistida que visam prevenir a transferência de embriões portadores de

doenças genéticas graves. O DGPI envolve a fertilização *in vitro* após a micromanipulação e biópsia do primeiro corpúsculo polar antes da fertilização, ou biópsia do blastômero (número total de células varia entre 6 e 12) antes da implantação do pré-embrião e posterior diagnóstico de uma doença genética ou cromossômica, tendo como objetivo a transferência de embriões geneticamente normais no que respeita a doença estudada (Verlinsky et al., 1994). O DGPI permite a redução das interrupções de gravidez conseqüentes ao diagnóstico de patologia fetal e o não aumento da incidência de malformações congênitas nas gestações em que o DGPI foi realizado.

1.6.4.2- Diagnóstico Pré-Natal

Em portadores de mutações no gene da FC é possível realizar o diagnóstico pré-natal que permite a detecção de doenças genéticas ainda durante a gravidez. O principal objetivo deste teste é dar às famílias em risco informações para que elas possam fazer escolhas durante a gestação (Jorde et al., 2000), embora seu objetivo não seja o de simplesmente detectar anormalidades na idade fetal e permitir a interrupção da gravidez quando um defeito é indicado (Thompson et al., 2002). Os seus benefícios incluem: 1- Antecipar aos casais o conhecimento da saúde genética do feto e permitir opções de conduta, em países onde o aborto é permitido; 2 – Permitir que casais sob o risco de gerar filhos com um defeito, decidam-se pela gestação conscientes de que o distúrbio será confirmado ou não posteriormente; 3- Possibilitar que os pais se preparem psicologicamente para o nascimento de uma criança doente; 4- Ajudar no tratamento da criança após o nascimento, possibilitando o preparo dos profissionais de saúde que irão cuidar desta. Felizmente, o diagnóstico pré-natal proporciona um resultado normal na grande maioria dos casos, reduzindo a ansiedade dos pais e permitindo uma gravidez tranqüila.

Usando testes de DNA, tanto diretos (pelo estudo da mutação específica responsável pela doença genética) quanto indiretos (pelo estudo de marcadores ligados à mutação) é possível o diagnóstico pré-natal de um grande número de doenças gênicas.

1.6.4.2.1- Vilosidade Coriônica

Os vilos coriais ou vilosidades coriônicas são geneticamente representativos do feto. Eles podem ser obtidos por via transabdominal a partir de 11 semanas de gestação. A quantidade mínima de material necessária para o exame varia com o laboratório, sendo considerada ideal aproximadamente 20 mg da vilosidade. A biópsia de vilos coriais é segura para a mãe e o feto. Os dados atuais demonstram que o risco de perda fetal diretamente relacionada à coleta de vilosidades é certamente inferior a 0,5% quando o procedimento é realizado por profissional experiente (Pena, 2007; Pinto Junior, 2002). Num trabalho cooperativo, em 1974, Hahnemman refere que, após a 12ª semana, obtinham além do córion, o âmnion e havia perfuração de bolsa amniótica (Pinto Junior, 2002).

1.6.4.2.2- Amniocentese

A amniocentese realizada a partir da 14ª semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas embora, historicamente, ela tenha surgido na mesma época que se desenvolveram os primeiros trabalhos de coleta de vilosidades coriônicas (Pinto Junior, 2002). Consiste na obtenção do líquido amniótico que banha o feto através da punção da cavidade amniótica. As células presentes no líquido amniótico podem ser analisadas rapidamente em nível de DNA ou cultivadas por alguns dias para a realização de estudos cromossômicos. As células presentes no líquido que banha o bebê são originadas por descamação da pele, bexiga e trato gastrintestinal do feto. Apenas uma minoria destas células está viva e, portanto, a cultura é essencial. Geralmente existem células suficientes para iniciar a análise cromossômica em 8-10 dias. Ocasionalmente o crescimento é muito lento, necessitando de mais tempo para o resultado ou mesmo exigindo uma nova punção (Pinto Junior, 2002; Pena, 2007).

A contaminação do líquido amniótico aspirado com sangue materno ou fetal é uma das causas de falhas na cultura, além de interferir com a citogenética molecular. Estas situações podem ser evitadas com cuidados especiais durante a coleta do material,

incluindo a aspiração em uma seringa separada, dos primeiros 1 a 2 mL do líquido amniótico. Porém, todo líquido obtido deve ser encaminhado ao laboratório independente de seu estado, pois muitas vezes podem-se obter resultados válidos mesmo em circunstâncias adversas, evitando-se assim a necessidade de uma nova punção (Pena, 2007).

A amniocentese é muito segura para o feto e para a mãe e é realizada há quase 40 anos com sucesso. Os riscos e complicações maternas conseqüentes à realização de uma amniocentese são também pequenos quando a punção é realizada por profissional experiente com a ajuda de equipamentos de ultra-sonografia de alta qualidade e variam nos diferentes centros de 0,2% a 0,5% (Pinto Junior, 2002; Pena, 2007).

1.6.5- Diagnóstico Indireto Através de Polimorfismos Genéticos

O grande número de mutações no gene CFTR compromete o diagnóstico, já que vários passos são necessários para a obtenção do resultado. Assim, existem métodos que permitem diagnóstico indireto da mutação através de segregação de marcadores ligados à mutação e esta é também uma maneira de mapeamento genético.

Com isso, alguns estudos têm sido realizados a fim de encontrar marcadores moleculares que pudessem facilitar esse diagnóstico (European Working Group, 1990).

Quando um polimorfismo genético ligado a uma doença é descoberto, o caminho para futuras pesquisas é claro. Pesquisadores tentam descobrir marcadores que possuam ligações cada vez mais próximas a doença. Uma ligação mais próxima entre o marcador e a doença significa que os dois estão normalmente menos suscetíveis à recombinação genética na meiose.

Muitos polimorfismos de DNA estão claramente em desequilíbrio de ligação, ou seja, estão ligados ao gene da doença (Chehab et al., 1991). O não-usual alto grau de desequilíbrio de ligação sugere que uma grande fração das mutações do gene da FC descendem de uma única mutação (Beaudet et al., 1989).

1.6.5.1- Polimorfismo GATT

GATT é um polimorfismo intragênico de repetição em tandem da seqüência de nucleotídeos GATT, que dá o nome ao polimorfismo (STRP – “Short Tandem Repeat Polymorphism”). Localiza-se no íntron 6 do gene CFTR e também pode ser chamado de microssatélite, que são repetições de seqüência de dois a 20 nucleotídeos. Este polimorfismo pode apresentar 6 ou 7 repetições (Gasparini et al., 1990; Chehab et al., 1991)

1.6.5.2- Polimorfismo MP6-D9

MP6-D9 é um polimorfismo extragênico, localizado a aproximadamente 40pb da região 5' do gene CFTR. É um SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) onde a variação da seqüência de DNA é entre os nucleotídeos adenina e citosina. Essa variação afeta um sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Msp* I (Gasparini et al., 1991; Horn et al., 1990).

1.6.5.3- Polimorfismo TUB09

O polimorfismo TUB09, localizado no íntron 9 do gene CFTR, é um SNP onde há variação entre o nucleotídeo adenina e guanina na seqüência de DNA. Essa variação afeta um sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Mnl* I (Dork et al, 1991b).

1.6.5.4- Polimorfismo TUB18

TUB18 é um SNP intragênico, localizado no íntron 18 do gene CFTR. Nesse polimorfismo há a troca do nucleotídeo adenina por citosina na seqüência de DNA que forma um sítio de restrição para a enzima *Hinf* I (Dork et al, 1991b).

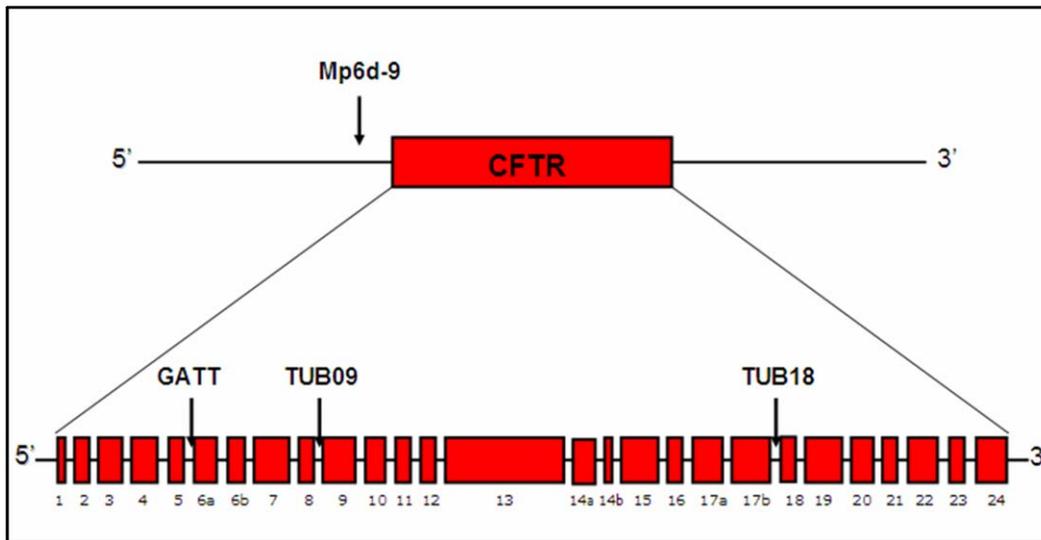


Figura 7- Localização do polimorfismo extragênico MP6-D9 e dos 3 polimorfismos intragênicos, GATT, TUB09 e TUB18 em relação ao gene CFTR.

1.7- Prognóstico da Fibrose Cística

O prognóstico da FC relaciona-se com a herança genética, presença de IP, sexo, idade de início e a gravidade das manifestações clínicas respiratórias. A presença da mutação $\Delta F508$, na forma homozigótica, relaciona-se com insuficiência pancreática, maior gravidade da doença pulmonar e colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* (Ribeiro et al., 2002). Com os avanços na terapêutica padronizada para pacientes com FC ao longo dos anos, a média de sobrevida aumentou. Enquanto que na década de 1950 todos os pacientes morriam até os 10 anos de idade, na década passada aproximadamente um terço dos pacientes com FC estava sobrevivendo até a idade adulta. Este aumento na média de sobrevida teve um impacto marcante na natureza da FC como doença infecciosa, uma vez que uma maior sobrevida dos pacientes com FC criou oportunidades para o estabelecimento de infecções por outras bactérias além de *Staphylococcus aureus*. Atualmente, *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno pulmonar mais prevalente nos pacientes com FC (Lyczak et al., 2002).

Dados do registro de pacientes com FC dos Estados Unidos demonstram que a média de idade do óbito aumentou de 8,4 anos em 1969 para 14,3 anos em 1998 e a média de tempo de sobrevida aumentou de 14 anos em 1969 para 32 anos em 2000. Outros países têm também apresentado melhora destas taxas, embora persistam diferenças significativas na sobrevida. Estas diferenças podem ser afetadas por estratégias de tratamento, acesso a centros especializados e condição socioeconômica (Ratjen e Doring, 2003). Uma análise multivariada acompanhou a evolução de 127 pacientes em Minas Gerais por um período de 20 anos. Foi usado um modelo estatístico que permitia uma avaliação objetiva do risco de morte e podia ser usado para aconselhamento da família do paciente. O estudo detectou um excesso de risco de morte nos pacientes com escore Shwachman abaixo de 70, idade ao diagnóstico menor que 3 anos e peso ao nascimento de menos de 3kg (Oliveira et al., 2002). O escore Shwachman avalia o estado geral dos pacientes correlacionando a nutrição, atividade geral, exames físicos e achados radiológicos. Para cada item avaliado é conferida uma pontuação que pode atingir o máximo de 25. Quanto menor a pontuação, e portanto o escore, pior o quadro clínico (Alvarez, 2002).

O fator idade ao diagnóstico poderia ser especulado como peculiar em países em desenvolvimento como o Brasil, possivelmente devido a somente casos de FC com apresentação clínica severa serem acompanhados, enquanto casos moderados a leves, especialmente em áreas rurais, podem ser subdiagnosticados. A intensidade das anormalidades pulmonares varia muito e os casos mais severos procuram mais precocemente por diagnóstico e tratamento. O diagnóstico tardio de casos clinicamente inaparentes ou menos severos não piora necessariamente o prognóstico (Camargos et al., 2000).

2- OBJETIVOS

Verificar:

Em uma amostra de pacientes com FC, os haplótipos existentes;

a possibilidade da utilização desses polimorfismos como marcadores para diagnóstico pré-natal;

a correlação entre a mutação $\Delta F508$ e os haplótipos encontrados.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp, parecer 346/2005 (Anexo 1). O paciente foi informado sobre os objetivos e procedimentos do projeto. Ao decidir participar do projeto deveria assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

3.1- Casuística

Foram analisados 53 famílias de pacientes fibrocísticos em seguimento no Ambulatório Multidisciplinar de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da UNICAMP, coordenado pelos Drs. Antonio Fernando Ribeiro e José Dirceu Ribeiro.

Como critério de inclusão foram selecionados apenas aqueles indivíduos que obtiveram resultado alterado em pelo menos dois testes do suor, com valores de cloro iguais ou superiores a 60 mEq/L e/ou o encontro das duas mutações do gene CFTR, trabalho realizado por Correia (2005), no laboratório de Genética Molecular Humana, FCM, UNICAMP.

Foram excluídos pacientes que não apresentavam os dois testes do suor alterados e/ou as duas mutações no gene CFTR.

3.2- Métodos

Foi realizada a coleta de sangue periférico para a extração do DNA e subsequente análise molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, quando necessário, digestão com enzimas de restrição específicas.

3.2.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

Procedemos à extração de DNA de leucócitos do sangue periférico conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986), com algumas modificações.

Dois tubos Vacuntainer com cerca de 5 mL de sangue periférico foram coletados, contendo, cada um deles EDTA 15% para impedir a coagulação sanguínea. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2.000 r.p.m. à temperatura ambiente para a separação e retirada do plasma. Em seguida, uma alíquota de 500 µL do sedimento foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL. A essa alíquota foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris - HCl pH7,5 10mM, MgCl₂ 5mM, Triton 100X). A solução foi então homogeneizada por 10 a 15 segundos e levada à centrífuga a 8000 r.p.m. por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395µL de tampão de digestão (Tris - HCl pH 7,5 EDTA 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 µL de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após 2 horas, foram adicionados 200µL de LiCl 7,5M em cada amostra e as soluções foram levadas à temperatura de – 20°C por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Após a transferência, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi invertido até formação de um precipitado visível. Foi realizada uma centrifugação a 13000 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% e nova centrifugação foi realizada (13000 r.p.m./5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi deixado à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual e ressuspendido em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose a 0,8%.

3.2.2- Reação em Cadeia da Polimerase

A análise dos polimorfismos ligados ao gene CFTR foi realizada pela técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês, “Polymerase Chain Reaction”). Esta técnica descrita por Saiki et al. (1971) possibilita a amplificação de uma pequena seqüência de DNA através do uso de dois iniciadores (“*primers*”) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, pareando-se devido à complementaridade de bases. A reação foi então colocada em um aparelho ciclador de temperatura onde repetidos ciclos de desnaturação

térmica do DNA, pareamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima *Taq* DNA polimerase, levam ao acúmulo exponencial da seqüência de DNA alvo. O procedimento utilizado em cada uma das reações está resumido na tabela 6. Os iniciadores, os tamanhos dos fragmentos e as enzimas de restrição específicas estão descritos nas tabelas 5 e 7.

Tabela 5- Descrição dos iniciadores utilizados na PCR dos polimorfismos, tamanho dos fragmentos resultantes desta reação.

Polimorfismo		Seqüência 5' - 3'	Tamanho do fragmento (pb)
GATT	S	TGAGCAGTTCTTAATAGATAA	6 repetições - 106
	AS	CAAGTCTTTCCTGATCTTCCTTC	7 repetições - 110
MP6-D9	S	AATGCAACAATTCACCCAATTGCTCA	377
	AS	GGTTAGGTCAGAGAACAAAGCAAATT	
TUB09	S	GCAGAGTACCTGAAACAGGA	491
	AS	CATTCACAGTAGCTTACCCA	
TUB18	S	GCCCGACAAATAACCAAGTGA	188
	AS	GGTAGGTTTACCTTCTGTTGGCATG	

No íntron 6A encontra-se o polimorfismo GATT que, por se tratar de uma repetição em tandem, possibilita analisar o resultado direto da PCR.

Nos heterozigotos aparece ainda uma banda com migração mais tardia, referente aos heteroduplexes, ou seja, fragmentos de DNA formados por uma fita de 106pb e outra de 110pb.

De acordo com os iniciadores descritos (Tabela 5), o indivíduo homozigoto para o alelo 6 gera um fragmento de 106pb e o homozigoto para o alelo 7 um de 110pb. Os indivíduos heterozigotos, portanto, apresentam fragmentos de 106 e 110pb.

Tabela 6 - Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para os polimorfismos.

Reagentes	GATT	MP6-D9	TUB09	TUB18
DNA (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
MgCl ₂ (1.0mM)	4.0	4.0	4.0	4.0
Tris-HCl pH 8,4 (10.0 mM)	2.0	2.0	2.0	2.0
dNTP (0.025 mM-cada)	1.0	1.0	1.0	1.0
iniciadores (0.2 pMoles-cada)	1.0	1.0	1.0	1.0
Taq polimerase (5 Unidades)	1.5	1.5	1.5	1.5
Água qsp (μL)	50.0	50.0	50.0	50.0
Programas	95 °C/5'	95 °C/5'	95 °C/5'	95 °C/5'
	95 °C/1'	95 °C/1'	95 °C/1'	95 °C/1'
	57 °C/1'	62 °C/1'	57 °C/1'	54 °C/1'
	72 °C/1'	72 °C/1'	72 °C/1'	72 °C/1'
	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'
Nº Ciclos	35	35	35	35

3.2.3- Digestão Enzimática

Para os polimorfismos MP6-D9, TUB09 e TUB18, após a PCR, foi realizada a digestão enzimática específica, segundo orientações do fabricante (Tabela 7).

Tabela 7- Descrição das condições para realização da digestão enzimática.

Polimorfismo	Enzima de Restrição	Temperatura ótima (°C)	Alelo	Tamanho do Fragmento (pb)
MP6-D9	<i>Msp</i> I	37	-	3.77
			+	173; 204
TUB09	<i>Mnl</i> I	37	A	15; 95; 104; 130; 147
			G	15; 130; 147; 199
TUB18	<i>Hinf</i> I	37	A	43; 63; 82
			C	43; 145

A análise do polimorfismo MP6-D9 utilizou digestão com a enzima *Msp* I após a PCR. Ou seja, o fragmento de 377pb produzido pela PCR é digerido em dois fragmentos de 173 e 204pb, na ausência do sítio de restrição, permanece com 377 pb.

Para a análise do polimorfismo TUB09, utilizou-se a enzima *Mnl* I. A enzima reconhece um sítio específico e cliva o amplificado da PCR em fragmentos de 15, 95, 104, 130 e 147pb para o alelo A e 15, 130, 147 e 199pb para o alelo G.

Para a análise do polimorfismo TUB18, utilizou-se a enzima *Hinf* I. A enzima reconhece um sítio específico e cliva o produto amplificado da PCR em fragmentos de 43, 63 e 82pb para o alelo A e 43 e 145pb para o alelo C.

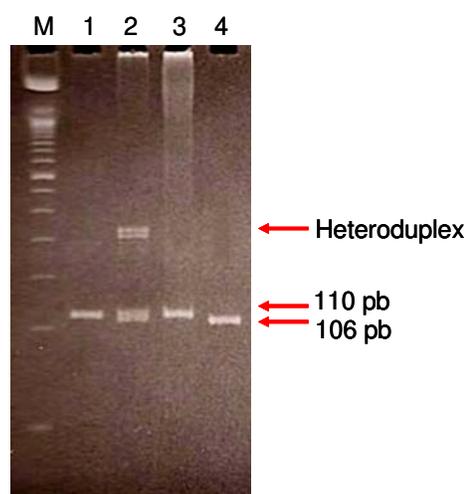


Figura 8- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% do polimorfismo GATT.

M – marcador de 50 pb.

Nas colunas 1 e 3 – indivíduos homocigotos para o alelo 7 (110pb).

Na coluna 2 – indivíduo heterocigoto (106 e 110pb), com presença de heteroduplex.

Na coluna 4 – indivíduo homocigoto para o alelo 6 (106pb).

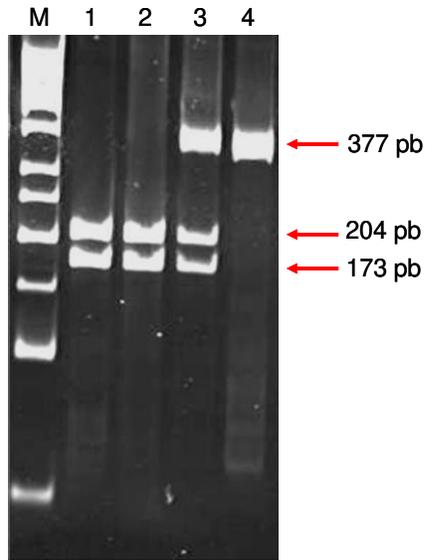


Figura 9- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo MP6-D9.

M - marcador de 50 pb.

Nas colunas 1 e 2 – indivíduos homocigotos para o alelo + (173 e 204 pb).

Na coluna 3 – indivíduo heterocigoto (173, 204 e 377 pb).

Na coluna 4 – indivíduo homocigoto para ao alelo - (377 pb).

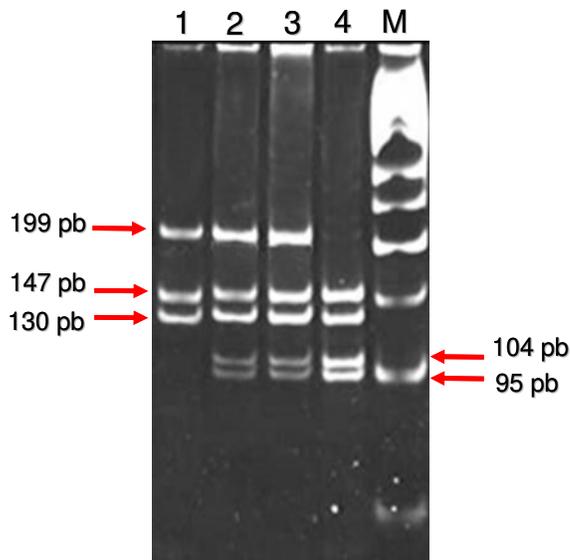


Figura 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo TUB09.

Na coluna 1 – indivíduo homocigoto para ao alelo G (130, 147 e 199 pb).

Nas colunas 2 e 3 – indivíduos heterocigotos (95, 104, 130, 147 e 199 pb).

Na coluna 4 – indivíduo homocigoto para o alelo A (95, 104, 130 e 147 pb).

M – marcador de 50 pb.

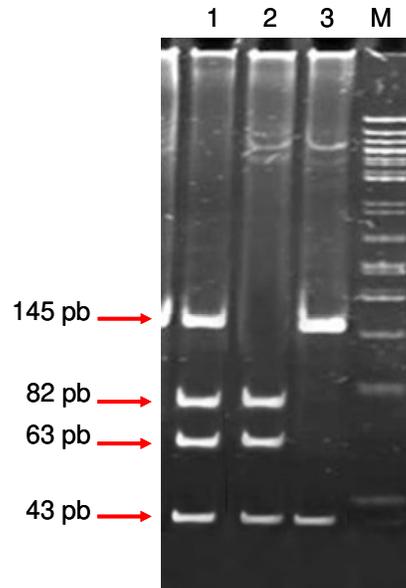


Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% do polimorfismo TUB18.

Na coluna 1 – indivíduo heterozigoto (43, 63, 82 e 145 pb).

Na coluna 2 – indivíduo homozigoto para o alelo A (43, 63 e 82 pb).

Na coluna 3 - indivíduo homozigoto para ao alelo C (43 e 145 pb).

M – marcador de 50 pb.

4- RESULTADOS

4.1- Caracterização da amostra.

Foram analisadas 53 famílias (compostas por 56 pacientes, 53 pais, 53 mães e outros 12 familiares). Entre os 112 cromossomos analisados de pacientes, 50% apresentavam a mutação $\Delta F508$ e 50% apresentavam outra mutação (não- $\Delta F508$).

4.2- Polimorfismos

4.2.1- GATT

Para o polimorfismo GATT foram analisados 47 pacientes (94 cromossomos). 60,63% destes possuem o alelo 6 e 52,6% dos cromossomos de familiares analisados apresentam o alelo 7. O alelo 6 está presente em 51,23% dos indivíduos, entre pacientes e familiares (Tabela 8).

Tabela 8- Frequência alélica do polimorfismo GATT

	6	7	Total
	n (%)	n (%)	
Pacientes	57 (60,63)	37 (39,37)	94
Familiares	109 (47,4)	121 (52,6)	230
Total	166 (51,23)	158 (48,77)	324

A maioria dos pacientes homocigotos para o a mutação $\Delta F508$ possuem o alelo 6 (66,66%) e dos pacientes que apresentam mutação não- $\Delta F508$ 60% possuem o alelo 7 (Tabela 9).

Tabela 9- Relação da frequência alélica do polimorfismo GATT com o genótipo CFTR.

	6	7	Total
	n (%)	n (%)	
$\Delta F508/\Delta F508$	24 (66,66)	12 (33,33)	36
$\Delta F508/X$	25 (65,78)	13 (34,22)	38
X/X	8 (40)	12 (60)	20
Total	57 (60,63)	37 (39,36)	94

4.2.2- MP6-D9

Para o polimorfismo MP6-D9 foram analisados 332 cromossomos. Entre pacientes e familiares, o alelo + está presente em 59,33% destes. Em pacientes e familiares, a frequência do alelo + é maior, 73,46% e 53,41%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10- Frequência alélica do polimorfismo MP6-D9

	-	+	Total
	n (%)	n (%)	
Pacientes	26 (26,54)	72 (73,46)	98
Familiares	109 (46,59)	125 (53,41)	234
Total	135 (40,67)	197 (59,33)	332

A maioria dos pacientes homocigotos $\Delta F508$ apresenta o alelo + (86,11%) e 55% dos pacientes com mutação não- $\Delta F508$ também apresentam o alelo + (Tabela 11).

Tabela 11- Relação da frequência alélica do polimorfismo MP6-D9 com o genótipo CFTR.

	-	+	Total
	n (%)	n (%)	
$\Delta F508/\Delta F508$	5 (13,89)	31 (86,11)	36
$\Delta F508/X$	12 (28,58)	30 (71,42)	42
X/X	9 (45)	11 (55)	20
Total	22 (23,41)	72 (76,59)	94

4.2.3- TUB09

Foram analisados 94 cromossomos de pacientes para o polimorfismo TUB09. Destes, 62,76% possuem o alelo G. Já em familiares, o alelo predominante nos cromossomos analisados foi o A (57,88%) (Tabela 12).

Tabela 12- Frequência alélica do polimorfismo TUB09

	A	G	Total
	n (%)	n (%)	
Pacientes	35 (37,24)	59 (62,76)	94
Familiares	125 (57,88)	91 (42,12)	216
Total	160 (51,61)	150 (43,38)	310

Nos pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$, encontrou-se a frequência de 91,17% para o alelo G e em pacientes que não apresentam a mutação $\Delta F508$ encontrou-se a frequência de 75% para o alelo A (Tabela13).

Tabela 13- Relação da frequência alélica do polimorfismo TUB09 com o genótipo CFTR.

	A	G	Total
	n (%)	n (%)	
$\Delta F508/\Delta F508$	3 (8,83)	31 (91,17)	34
$\Delta F508/X$	11 (32,36)	23 (67,64)	34
X/X	15 (75)	5 (25)	20
Total	29 (32,96)	59 (67,04)	88

4.2.4- TUB18

Para o polimorfismo TUB18 62 cromossomos foram analisados e a grande maioria, 87,09%, possui o alelo C, como em familiares onde a frequência do alelo C também foi maior (79,83%) (Tabela 14).

Tabela 14- Frequência alélica do polimorfismo TUB18.

	A	C	Total
	n (%)	n (%)	
Pacientes	8 (12,91)	54 (87,09)	62
Familiares	25 (20,17)	99 (79,83)	124
Total	33 (17,75)	153 (82,25)	186

Em pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$ encontrou-se o alelo C em 94,44%. Em pacientes que não apresentam a mutação $\Delta F508$, a frequência do alelo C também é alta (77,77%) (Tabela 15).

Tabela 15- Relação da frequência alélica do polimorfismo TUB18 com o genótipo CFTR.

	A	C	Total
	n (%)	n (%)	
$\Delta F508/\Delta F508$	1 (5,56)	17 (94,44)	18
$\Delta F508/X$	3 (13,64)	19 (86,26)	22
X/X	4 (22,23)	14 (77,77)	18
Total	8 (13,8)	50 (86,2)	58

4.3- Haplótipos

Foi possível detectar os haplótipos em 34,8% dos 112 cromossomos (54 pacientes). Foram encontrados 9 haplótipos diferentes em 38 cromossomos analisados. Destes, 25 estão ligados à mutação $\Delta F508$ e 13 ligados a outras mutações (não- $\Delta F508$), descritos Tabela 16.

O haplótipo I foi o mais freqüente, encontrado em 64% dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$ e em 23,07% dos cromossomos ligados a outras mutações.

O haplótipo II foi encontrado em 12% dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$ e em 7,69% dos cromossomos ligados a outras mutações.

O haplótipo III foi encontrado apenas em cromossomos ligados a mutação $\Delta F508$ (4%), assim como os haplótipos IV e V, ambos encontrados em 8% dos cromossomos ligados a $\Delta F508$.

Outros 4 diferentes haplótipos foram encontrados apenas em cromossomos ligados a outras mutações. VI, VII, VIII e IX com frequências de 30,76%, 7,69%, 15,38% e 15,38% respectivamente.

Tabela 16- Distribuição haplotípica dos pacientes com FC.

Haplótipo	Polimorfismos				$\Delta F508$	Outra mutação
	GATT	MP6-D9	TUB09	TUB18	N (%)	N (%)
I	6	+	G	C	16 (64)	3 (23,07)
II	7	+	G	C	3 (12)	1 (7,69)
III	7	+	A	C	1 (4)	0
IV	6	-	A	C	2 (8)	0
V	6	+	A	C	2 (8)	0
VI	7	+	A	A	0	4 (30,76)
VII	6	+	G	A	0	1 (7,69)
VIII	7	-	A	C	0	2 (15,38)
IX	6	-	A	A	0	2 (15,38)
Total					25	13

4.4- Origem Parental

Os polimorfismos foram analisados quanto à informação da origem parental dos alelos.

Das 51 famílias analisadas para o polimorfismo GATT, 47 foram informativas quanto à origem parental dos alelos. Para o polimorfismo MP6-D9, 52 famílias foram analisadas e em 36 foi informativo. Para o polimorfismo TUB09, 46 famílias foram

analisadas e em 34, destas, o polimorfismo foi informativo. Já para o polimorfismo TUB18, 20 famílias foram analisadas e, em apenas 9 delas, o polimorfismo foi informativo e em 11 não foi informativo (Tabela 17).

Tabela 17- Relação dos números de famílias nas quais os polimorfismos foram informativos.

	GATT	MP6-D9	TUB09	TUB18
Informativo	47	36	34	9
Não Informativo	4	16	12	11
Total	51	52	46	20

4.5- Uso para Diagnóstico Pré-natal e Pré-implantacional

Das 53 famílias analisadas, em 23 encontrou-se pelo menos um polimorfismo informativo para o diagnóstico pré-natal ou pré-implantacional e, em 30 famílias, nenhum polimorfismo analisado foi informativo (Tabela 18), ou seja, em 43,4% das famílias é possível fazer o diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.

Tabela 18- Número de famílias onde o haplótipo foi informativo para ser usado como diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.

	Famílias
Informativo	23
Não-informativo	30
Total	53

5- DISCUSSÃO

A estimativa é que, no Brasil, menos de 10% do total anual de casos de FC são diagnosticados (Raskin, 2001). Usualmente é identificada na infância e cerca de 8% dos casos são diagnosticados após os 10 anos de idade (Fitz-Simmons, 1993).

Estudos das 6 principais mutações na população brasileira mostram que apenas 40% das mutações são detectadas com a análise das mutações mais frequentes (Correia, 2005)

A análise molecular genética é o único método que permite a detecção correta de portadores de FC. Por outro lado, esta aplicação é restrita àquelas famílias em que a criança afetada apresenta uma mutação conhecida. Desde que muitas crianças com FC já estudadas são heterozigotas e carregam uma mutação ainda não caracterizada e sua identificação direta de portadores é limitada (Cabello et al., 2005)

Uma alternativa ao diagnóstico direto das mutações seria o diagnóstico indireto por meio da análise de alguns polimorfismos (haplótipos) que estejam ligados a determinadas mutações.

Dado a alta porcentagem de heterozigotos afetados por uma mutação desconhecida entre a população estudada, devido ao grande número de mutações no gene CFTR e o alto custo que significaria a análise de cada uma delas, a aplicação deste tipo de análise constitui uma boa alternativa para a confirmação de pacientes e detecção de portadores (Estivill, 1987). Estima-se que na população brasileira, em média, 1 em cada 25 pessoas são portadores de uma mutação no gene CFTR. Quando existe história familiar, o risco de ser um portador aumenta segundo o grau de parentesco com o indivíduo afetado. (Visich et al., 2001).

A determinação da qualidade de portador ou confirmação do doente, de acordo com o haplótipo, é dada pela baixa fração de recombinação para os 4 marcadores utilizados, amplamente documentada na literatura. Os marcadores se expressam de forma mendeliana co-dominante, o que permite determinar, sem dúvidas, o genótipo do indivíduo nesse locus (Riveros et al., 2005).

Com isso, alguns estudos têm sido realizados a fim de encontrar marcadores moleculares que pudessem facilitar esse diagnóstico.

No presente estudo, o haplótipo de cada cromossomo parental foi determinado usando o indivíduo afetado como base. Estudamos três marcadores intragênicos e um extragênico em 53 famílias, com o propósito de validar o uso destes marcadores em estudo de ligação na população analisada, bem como a distribuição desses polimorfismos nesta população fibrocística.

De acordo com os numerosos antecedentes bibliográficos não há recombinação entre os marcadores estudados e o gene CFTR. Os marcadores utilizados mostram forte desequilíbrio de ligação com o gene CFTR (Chehab et al., 1991; Dork et al., 1992; Gasparini et al., 1991).

Para o polimorfismo GATT encontramos uma frequência de 60,63% para o alelo 6 e 39,37% para o alelo 7.

Gasparini et al. (1991) descreveram 84% de frequência para o alelo 7 e 13 % para o alelo 6.

Já Chehab et al.(1991) encontraram o alelo 7 em uma frequência de 49,5% e o alelo 6 com uma frequência de 8% em cromossomos normais, sendo que, em homozigotos para $\Delta F508$, foi encontrada uma completa associação com o alelo 6, como encontrado neste trabalho.

Dork et al. (1992) encontraram, em seu trabalho, que, dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$, todos possuíam o alelo 6, assim a frequência do alelo 7 foi nula nesta amostra.

Gimbovskaia et al. (1994) relatam que, dos indivíduos analisados em seu trabalho que possuíam a mutação $\Delta F508$, todos eram portadores do alelo 6, enquanto que a maioria dos cromossomos que não possuíam esta mutação tinha o alelo 7, confirmando a frequência encontrada em nossa pesquisa.

O polimorfismo MP6-D9 neste trabalho foi encontrado com uma frequência de 26,54% para o alelo - e de 73,46% para o alelo +. Gasparini et al. (1990) demonstraram uma frequência de 63% para o alelo + e nula para o alelo -. Huth et al. (1989) têm uma frequência de 87% para o alelo - e de 13% para o alelo +.

Macek et al. descreveram (1997) que todos os homozigotos $\Delta F508$ possuem o alelo + e em nosso trabalho 86,11% dos homozigotos $\Delta F508$ apresentaram o alelo +.

Para o polimorfismo TUB9, Dork et al. (1992) demonstraram que dos cromossomos analisados que possuíam a mutação $\Delta F508$, todos eram portadores do alelo G deste polimorfismo, enquanto a frequência do alelo A foi nula. Estes dados estão de acordo com os apresentados neste trabalho, onde os homozigotos para a mutação $\Delta F508$ 91,17% possuem alelo G. A frequência encontrada do alelo G em nosso estudo foi de 62,76% e a do alelo A foi de 37,24%.

Para o polimorfismo TUB18, neste estudo, a frequência do alelo C foi 87,09% e para o alelo A foi de 12,91%.

Claustres (1996), em uma pesquisa no sul da França, encontrou o alelo C associado a cromossomos normais e o alelo A associado a cromossomos com a mutação $\Delta F508$, diferente do encontrado nesse trabalho, onde foi encontrada a frequência de 0,94 do alelo C em pacientes que apresentam a mutação $\Delta F508$ em homozigose. Essa diferença pode ser devido à miscigenação encontrada na população brasileira.

Dork et al. (1991b) referem que o alelo C está em 76% dos cromossomos de indivíduos não-fibrocísticos, enquanto A está em 24%, o alelo C está relacionado a 96% dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$ e o alelo A está relacionado apenas 4% com a mutação. O alelo A está presente em 37% dos cromossomos com mutação não- $\Delta F508$ e o alelo C em 63%. Esses resultados concordam com os encontrados neste estudo, onde o alelo C está relacionado a 94,44% dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$ e o alelo A está presente em 22% dos cromossomos com mutação não- $\Delta F508$.

Sazanova et al. (1997) realizaram um estudo na Rússia, onde descobriu que o alelo A é 2,1 vezes mais freqüente em cromossomos não- $\Delta F508$ de pacientes em relação à presença do alelo em pacientes sem a doença e o alelo C demonstrou desequilíbrio com a mutação $\Delta F508$, resultado compatível com o deste estudo.

Quando analisamos os polimorfismos em conjunto (haplótipos), verificamos que o haplótipo I mostrou-se presente em 64% dos cromossomos que portavam a mutação $\Delta F508$. Esse dado demonstra que, no decorrer da distribuição da mutação pelas gerações, houve certo nível (36%) de recombinação. Mas de qualquer maneira gera mais uma evidência da origem única dessa mutação no mundo.

Apesar da alta prevalência do haplótipo I entre os pacientes $\Delta F508$, esses dados permitem afirmar que a utilização do haplótipo não deve ser utilizada em nossa população para diagnóstico da mutação $\Delta F508$. Para as outras mutações, seria necessário identificá-las para fazer tal análise.

Os polimorfismos individualizados, por outro lado, parecem dar um grau de discriminação maior, como o polimorfismo TUB18, onde todos os cromossomos $\Delta F508$ possuíam o alelo C, mas esse alelo também existia em cromossomos não $\Delta F508$.

Outra utilização desse tipo de análise é como suplemento ao diagnóstico genético direto (Riveros e Ríos, 2005), para controle dos testes diretos e no caso de diagnóstico pré-natal, tanto para controle, como para diagnóstico propriamente dito.

A inclusão de marcadores intragênicos, como microssatélites localizados em íntrons e outros, próximos ao gene, diminuem a possibilidade de recombinação entre ambas as regiões e o risco de falsos positivos e falsos negativos. Análises de polimorfismos são extensamente utilizadas em diagnóstico pré-natal, o que tem enorme importância em famílias de alto risco, já que possibilitam o início de um tratamento precoce da doença, contribuindo para um melhor prognóstico e qualidade de vida para o recém-nascido (Riveros e Ríos, 2005).

Neste estudo, 43,39% das famílias possuíam um polimorfismo informativo para realizar o diagnóstico pré-natal ou pré-implantacional. Para aumentar a segurança seria interessante contar com pelo menos mais de um polimorfismo.

De qualquer modo, a alta prevalência de polimorfismos informativos, demonstra a viabilidade da utilização desses polimorfismos no diagnóstico pré-natal em núcleos familiares em acompanhamento em nosso serviço.

Esperamos que futuros estudos, com a identificação de todas as mutações, permitam estabelecer todas as possíveis associações que reflitam o perfil próprio da nossa população e que nos ajudem a compreender a origem e natureza das mutações no gene CFTR na população brasileira.

6- CONCLUSÃO

A frequência dos alelos dos polimorfismos nesta amostra foi similar à encontrada em outras populações, exceto o polimorfismo TUB18, que apresentou maior frequência do alelo C;

Foram encontrados 9 haplótipos diferentes na amostra de pacientes fibrocísticos utilizando os polimorfismos GATT, MP6-D9, TUB09 e TUB18;

O haplótipo I (6, +; G; C) foi o mais frequente (48%) e foi encontrado em 64% dos cromossomos com a mutação $\Delta F508$, mostrando existir um desequilíbrio de ligação, mas não uma ligação total;

O alelo C do polimorfismo TUB18 está presente em todos os haplótipos ligados à mutação $\Delta F508$, bem como, em menor proporção, em cromossomos com mutação não $\Delta F508$.

Os haplótipos e os polimorfismos individualizados não são boas ferramentas para a identificação da mutação $\Delta F508$ entre nossos pacientes;

Os polimorfismos mostraram ser viáveis para utilização em diagnóstico pré-natal e pré-implantacional. Tanto como controle, como nos casos em que não temos todas as mutações do núcleo familiar identificadas, através do diagnóstico indireto.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accurso FJ, Sontag MK. Seeking Modifier Genes in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 289-293.

Alvarez AE. Análise clínica e laboratorial de 104 pacientes, com Fibrose Cística, do ambulatório de pediatria da Unicamp, na última década do século XX, com o genótipo e a gravidade da doença. Dissertação. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 1938; 56: 341-99.

Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 1946; 72:62.

Anderson MP, Gregory R J, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-205.

Anderson MP, Sheppard DN, Berger HA. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am J Physiol* 1992; 263: L1-L14.

Assael BM, Castellani C, Ocampo MB, Iansa P, Callegaro A, Valsecchi MG, et al. Epidemiology and survival analysis of cystic fibrosis in an area of intense neonatal screening over 30 years. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 397-401.

Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 1992; 68: 809.

Beaudet AL, Feldman, GL, Fernbach SD, Buffone GJ, O'Brien WE. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis, and genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 319-26.

Bedrossian CWM, Greenberg SD, Singer DB. The lung in cystic fibrosis: a quantitative study including prevalence of pathological finding among different age groups. *Hum Patol* 1976; 7: 196.

Bernardino LF, Lima CE, Zats M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. *Genet Molec Biol* 2003; 26 (1): 1-3

Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations – correlation with the incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19: 575-606.

Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 1986; 78:1245-52.

Boyer PH. Low birth weight in fibrocystic disease of the pancreas. *Pediatrics* 1955; 16: 78.

Cabello GMK, Cabello PH, Lopez-Camelo JS, Juan C, Llerena JR, Fernandes O, Haplotype distribution of and linkage disequilibrium between four polymorphic markers near the CFTR locus in brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol* 2005; 77(6): 853-865.

Camargos PA, Guimarães MD, Reis FJ. Prognostics aspects of cystic fibrosis in Brazil. *Ann Trop Paediatr* 2000; 20(4): 287-291.

Campos JVM, Kotze LMS, Damaceno N, Carvalho CRR. Fibrose Cística – Mucoviscidose. São Paulo. IBEPEGE. *Arquivos de Gastroenterologia*; 1996, 48p.

Central de Aconselhamento e Laboratório de Genética. Disponível em: <http://www.genetika.com.br>. Acesso em: 20 de agosto de 2007.

Chehab FF, Johnson J, Louie E, Goossens M, Kawasaki E, Erlich H. A dimorphic 4-pb repeat in the cystic fibrosis gene is in absolute linkage disequilibrium with $\Delta F508$ mutation: implications for prenatal diagnosis and mutation origin. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 223-226.

Chillón M, Nunes V, Casals T, Jimenez FJ, Fernandez E, Benitez J, et al. Identification of a new missense mutation (P2055) in the CFTR gene associated with a mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mol Genet* 1993; 10 : 1741-1742.

Chillón M, Casals T, Mercier B. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of vas deferens. *N Engl J Med* 1995; 332: 1475-80.

Chomel JC, Haliassos A, Tesson L, Kaplan JC, Kitzis A. Frequency of the major CF mutation in French CF patients. *Hum Genet* 1990; 85: 397.

Claustres M, Desgeorges M, Moine P, Morral N, Estivill X. CFTR haplotypic variability for normal and mutant genes in cystic fibrosis families from southern France. *Hum Genet* 1996;98 (3):336-44.

Collins, FS Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256: 774- 779.

Correia CAA, Prevalência de Seis Mutações no Gene CFTR Em Portadores de Fibrose Cística da Região de Campinas. Dissertação. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Cystic Fibrosis Foundation – CFF. Disponível em: <http://www.cff.org>. Acesso em 20 de outubro de 2007.

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium - CFGAC. The Cystic fibrosis mutation database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. Acesso em 20 de agosto de 2007.

Davis PB, Drumm M, Konstan MW, Cystic Fibrosis. *Am J Crit Care Med* 1996; 154: 1229-1256.

Dawson KP, Frossard PM, The geographic distribution of cystic fibrosis mutations gives clues about population origins. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 496-99.

Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas Aeruginosa* infection. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1041-1049.

Devlin TM. Manual de bioquímica com correlação clínica. São Paulo (SP): Ed. Edgar Blucher LTDA, 1998.

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953; 12: 549.

Dork T, Wulbrand U, Richter T. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 1991a; 87: 441- 446.

Dork T, Wulbrand U, Tümmler B. A HinfI polymorphism in the cystic fibrosis gene CFTR. *Nucleic Acids Res.* 1991b May 11; 19(9): 2517

Dork T, Neumann T, Wulbrand U, Wulf B, Kalin N, Maab G, et al., Intra- and extragenic haplotype of CFTR mutations in cystic fibrosis families. *Hum Genet* 1992; 88: 417-25.

Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis syntenry. *Clin Genet* 1985; 28: 265-271.

Estivill X, Scambler PJ, Wainwright BJ, Hawley K, Frederick P, Schwartz M, et al. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987; 1:257-263.

Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nature Genetics* 1996; 12: 348-350.

European Working Group. *Hum Genet* 1990; 85: 39-454.

Evans AK, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of the meconium ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *Eur Resp J* 2001; 18(5): 784-789.

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wiener Klin. Wochen.* 86: 753, 1936.

Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. *J Michigan Med Soc* 1945; 44:587.

Faria EJ. Investigação da Associação Entre os Polimorfismos dos Genes: *MBL2*, *TGF- β 1* E *CD14* com a gravidade do quadro pulmonar na fibrose cística. Tese. Campinas (SP) Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Feuillet-Fieux MN, Ferrec M, Gigarel N, Thuillier L, Sermet I, Steffan J, et al. Novel CFTR mutations in black cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 2004; 65: 284-87.

Fitz-Simmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 1993; 122: 1-9.

Frizzell RA. Functions of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 54-58.

Gasparini P, Novelli G, Estivill X, Olivieri D, Savoia A, Ruzzo A, et al. The genotype of a new linked DNA marker, MP6-D9, is related to the clinical course of cystic fibrosis. *J Med Genet* 1990; 27: 17- 20.

Gasparini P, Dognini M, Bonizzato A, Pignatti PF, Morral N, Estivill X. A tetranucleotide repeat polymorphism in the cystic fibrosis gene. *Hum Genet* 1991; 86: 625.

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

Gilljam M, Antoniou M, Shin J, Dupuis A, Corey M, Tullis DE. Pregnancy in cystic fibrosis. Fetal and maternal outcome. *Chest* 2000; 118(1): 85-91.

Gimbovskaia SD, Kalinin VN, Ivashchenko TE, Baranov VS. Molecular - genetic analysis of certain mutations of the “cystic fibrosis gene” in Moldavia. Characteristics of molecular markers and their linkage with various mutations. *Genetika* 1994; 30(2): 616- 30.

Hahnemann N. Early prenatal diagnosis: A study of biopsy techniques and cell culturing techniques from extraembryonic membrane. *Clin Genet* 1974; 6: 294-306

Hodson ME. Thematic Review series: Treatment of cystic fibrosis in the adult. *Respiration* 2000; 67: 95-607.

Horn GT, Richards B, Merrill JJ, Klinger KW. Characterization and rapid diagnostic analysis of DNA polymorphisms closely linked to the cystic fibrosis locus. *Clin Chem* 1990; 36: 1614-1619.

Hull J. Basic science of cystic fibrosis. *Current Paediatr* 2003; 13: 253-258.

Huth A, Estivill X, Grade K, Billwitz H, Speer A, Rosenthal A, et al. Polymerase chain reaction for detection of the pMP6d-9/MspI RFLP, a marker closely linked to the cystic fibrosis mutation. *Nucleic Acids Res*, Sep 1989; 17: 7118.

Jorde LB, Carey JCC, Bamshad MJ, White RL. *Genética médica*. Rio de Janeiro (R J): Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Kaplan E, Swachman H, Permuter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclan DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1968; 279: 56-69.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.

Knowles MR. Gene modifiers of lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12: 416-21.

Knowles MR, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *New Engl J Med* 1981; 305: 1489.

Knowlton RG, Cohen-Haguenaer O, Cong. NV, Frézal J, Brown VA, Brarker D, et al., Polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis located on chromosome 7. *Nature* 1995; 318: 380-382.

Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol* 2001; 31: 1-12.

Korst RJ, McElvaney NG, Chu CS, Rosenfeld MA, Mastrangeli A, Hay SL, et al. Gene Therapy for the Respiratory Manifestations of Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: S75-87.

Landsteiner K. Darmverschluss durch eingedicktes meconium; pankreatites. *Zentrabl Allg Path* 1905; 6: 903.

Lyczak BJ, Cannon CL, Pier GP. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol Rev* 2002; 15: 194 – 222.

Macek M Jr, Macek M Sr, Krebsová A, Nash E, Hamosh A, Reis A, et al. Possible association of the allele status of the CS.7/*Hha*I polymorphism 5' of the CFTR gene with postnatal female survival. *Hum Genet* 99, 1997; 565–572.

MacLusky I, Levison H. Cystic fibrosis. In: Chernick V, Boate TE. *Kendig's disorders of the respiratory tract in children*. Philadelphia Saunders 1990; 692-729.

Massie RJ, Plsen M, Galzner J, Robertson CF, Francis I. Newborns screening for cystic fibrosis in Vistoria: 10 years experience (1989- 1998). *Med J Aust* 2000; 172 (12): 584-87.

McKone EF, Emerson SS, Edwards K, Aitken M. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective study. *Lancet* 2003; 361, 1671-1

Moutou C, Gardes N, Viville S. Multiple PCR combining $\Delta F508$ mutation and intragenic microsatellites of the CFTR gene for pre- implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J of Hum Gen* 2002; 4(10): 231-38.

Objectives and Outline. Disponível em: <http://www.lclark.edu>, Acesso em 20 de agosto de 2007.

Oliveira MC, Reis FJ, Oliveira EA, Colosimo EA, Monteiro AP, Penna FJ. Prognostic factors in cystic fibrosis in a single center in Brazil: a survival analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34:3-10.

Parizotto EA, Ribeiro AF, Costa FF, Bertuzzo CS. Molecular characterization of cystic fibrosis patients in the state of the São Paulo (Brasil). *J Med Genet* 1997; 34 (10): 877.

Pena SDJ. Diagnóstico pré-natal, disponível em www.laboratório gene.info, acesso em 28 de agosto de 2007.

Pinto Junior W. Diagnóstico pré-natal. *Ciênc saúde coletiva* , Rio de Janeiro, v. 7, n.1, 2002 .

Quinton PM. Cystic Fibrosis: a disease in electrolyte transport. *Faseb J* 1990; 4: 2709-17.

Quinton PM, Bijman J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *New Engl J Med* 1983; 308: 1185.

Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *Endocrinol Invest* 2000; 23: 684-89.

Raskin S, Phillips III, JA, Krishnamani MRS. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993, 46: 665-69.

Raskin S, Faucz F. Aspectos genéticos da fibrose cística. In: Carakushansky, G. *Doenças genéticas*. Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan, 2001. 227-241.

- Ratjen F, Doring G. Seminar – Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; 361, 681–688.
- Reis FJC, Damaceno N. Fibrose cística. *J Pediatr* 1998; 74: S46-94.
- Ribeiro JD, Ribeiro MAG De, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr* 2002; 78 (s2):171-86.
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis CFTR gene. *Nature* 1990; 347: 358-363.
- Riordan JR. Identification of the cystic fibrosis gene. *Science* 1989; 245: 1066-73.
- Riveros NK, Ríos JH. Detección indirecta de portadores de fibrosis quística en dos familias chilenas mediante análisis de polimorfismos en el ADN asociados fuertemente al gen CFTR. *Rev Méd Chile* 2005; 133:648-654.
- Robinson P. Pediatric origins of adult lung disease: Cystic Fibrosis. *Thorax* 2001; 56: 237- 41.
- Rommens MJ. Identification of the cystic fibrosis gene II. *Science* 1989; 245: 1059-65.
- Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med* 1998; 19(3):423-41.
- Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132:589-9.
- Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutation. *Annals of Hum Genet* 2003; 67: 471-85.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullins KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56: 341- 346.
- Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J of Med Genet* 2002; 111: 88-95.
- Sazonova MA, Amosenko FA, Kapranov NI, Kalinin VN. Molecular genetic analysis of TUB18 and TUB20 intragenic polymorphism and various mutations of the CFTR gene in the Moscow region. *Genetika* 1997 Sep;33(9):1303-7.

- Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997;336(7):487-91.
- Streit C, Bulamarque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene: molecular analysis in patients from south brazil. *Mol Genet And Met* 2003; 78:259-64.
- Sturgess JM. Morphological characteristics of bronchial mucosa in cystic fibrosis. In: Quiton PM, Martinez JR, Hopfer U. Fluid and eletrolyte anormalities in exocrine glands in cystic fibrosis. San Francisco. San Francisco Press, 1982.
- Tebbutt SJ, Lakerman MB, Wheeler JCW, Hill DF. Genetic variation within the ovine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Mutation Research Genomics* 1998; 382: 93-98.
- Thompson, MW, Mcinnes RR, Huntington, FW. In: *Genética Médica, 6ª Edição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- Tomashefski JR, Bruce M, Goldberg HI. Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis. *Am Rev Resp Dis* 1986; 133: 535.
- Tsui LC. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 47-53.
- Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 32: 115–142.
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator : an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002; 1: 13-29.
- Verlinsky Y, Kuliev A, Dyban A. Preconception diagnosis of single gene and chromosomal disorders. *Hum Reprod* 1994; 9: 182 - 183.
- Visich AA, Barreiro CZ, Chertkoff LP. Caracterizacion de tres microsatelites del gen de fibrosis quística em familias argentinas. *Medicina* 2001; 61: 1.
- Wainwrigth BJ, Scamber PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, et al. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. *Nature* 1985; 318:284-285.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-54.

Welsh M, Ramsey BW, Accurso F, Cutting, GR. Cystic Fibrosis. In: Scriver AB, Sly WS, Valle D. editors. *The molecular and metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw- Hill; 2001. p 5121-5188.

Wilcken B, Wiley V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Pediatr Resp Rev* 2003; 4:272-7.

Wilmott RW. Making the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1998; 132(4):563-5.

Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcon ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Daves, K. E. *Human genetic disease-a practical approach*. Oxford.: IRL Press Limited, 1986, pp51- 64.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431.

Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67: 117-33.

Zielenski J, Tsui LP. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. *Anu Rev Gen* 1995; 29: 777-807.

8- ANEXOS

ANEXO 1- Parecer do comitê de ética em pesquisa.



CEP, 24/08/05.
(Grupo I)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP.

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 346/2005

CAAE: 0169.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “HAPLÓTIPOS DA REGIÃO GÊNICA CFTR EM NÚCLEOS FAMILIARES DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniela Tenório Furgeri

INSTITUIÇÃO: Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas e no Laboratório de Genética Molecular – FCM - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/07/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/07/06

II - OBJETIVOS

Verificar em uma amostra de pacientes com fibrose cística os haplótipos existentes, bem como verificar a possibilidade da utilização desses polimorfismos como marcadores para diagnóstico pré-natal.

III - SUMÁRIO

Serão averiguados núcleos familiares de pacientes fibrocísticos em seguimento no Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria/HC/UNICAMP. Os DNAs que serão utilizados são de um banco de DNAs do laboratório de genética molecular, formado por um projeto anterior e que estão sob os cuidados da Profa Dra Carmen S.Bertuzzo. O reconhecimento do polimorfismo será efetuado pela análise molecular em uma amostra de sangue periférico. E os polimorfismos averiguados serão: XVG2c, KM19, MP6-D9, J44, TUB9 e TUB18.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está justificado e com estrutura adequada. Os pacientes serão informados do resultado e receberão orientação genética, bem como seus familiares, pela Dra Carmen Silvia Bertuzzo. O orçamento está descrito, e será financiado pela FAPESP.

A pesquisadora incluiu o TCLE no estudo (falta alterar o texto do estudo). Esclarecendo ao sujeito que o sangue será armazenado e pede autorização para utilizá-lo em pesquisas posteriores de fibrose cística. Com a aplicação do TCLE, ficam mais coerentes as orientações genéticas realizadas com o resultado da pesquisa.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa (Versão de 21/04/05), bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de agosto de 2005.


Prof. Dr. Sebastião Araújo

VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas

Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISAS COM SERES HUMANOS

Título do projeto: Haplótipos da Região Gênica CFTR Em Núcleos Familiares de Pacientes Com Fibrose Cística.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com Fibrose Cística. O objetivo geral do estudo é o de identificar alterações no gene CFTR para um diagnóstico preciso de pacientes com quadro clínico compatível de Fibrose Cística. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Será coletada uma amostra de sangue venoso (20 mL, o equivalente a 1 colher de sopa) sendo necessária a coleta de sangue também dos pais. Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 20 mL de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue

geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não há expectativa de que os resultados deste trabalho tragam benefício imediato a mim e a meus familiares e que a única vantagem que poderei obter é saber quais alterações no gene CFTR que eu possuo. Além de que, esse método pode não detectá-las. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as conseqüências serão devidamente explicadas a meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (19) 3788- 8902 (Daniela Tenório Furgeri).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Fui informado que esse material genético será guardado e que qualquer outro projeto que pretenda utilizá-lo, deverá ser aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FCM e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, tel. (019) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____
explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos
ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim
como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar
desse estudo.

Nome e RG participante (ou responsável)

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir
do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma
cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

