

CYNTIA ARIVABENI DE ARAUJO CORREIA

**PREVALÊNCIA DE SEIS MUTAÇÕES NO GENE *CFTR*
EM PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA DA REGIÃO
DE CAMPINAS**

CAMPINAS

2005

CYNTIA ARIVABENI DE ARAUJO CORREIA

**PREVALÊNCIA DE SEIS MUTAÇÕES NO GENE *CFTR*
EM PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA DA REGIÃO
DE CAMPINAS**

*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): Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Bertuzzo

CAMPINAS

2005

Nº CHAMADA	
T/UNICAMP	
C817 p	
V	EX
TOMBO BC/ 66555	
PROC. 16-P-00086-05	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/12/05
Nº CPD	

18 10 : 37 43 07

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

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

C817p

Correia, Cyntia Arivabeni de Araujo

Prevalência de seis mutações no gene *CFTR* em portadores de fibrose cística da região de Campinas. / Cyntia Arivabeni de Araújo Correia. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Mutação. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Membros:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

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

Data: 25/05/2005

DEDICATÓRIA

À minha mãe Neusa, meus irmãos, Christiano e Vanter, enfim minha família, por todo apoio e torcida, que possibilitaram a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve agradecer a muitas pessoas que, de diferentes maneiras, estiveram envolvidas nele.

Antes de qualquer coisa, agradeço a Deus, que por meio de Jesus Cristo, tem me sustentado para continuar seguindo meu caminho.

À minha mãe, e família, agradeço pela paciência que tiveram comigo durante a realização deste e por todo apoio que recebi para continuar caminhando sem desistir.

Ao meu namorado, Jean, por todo seu carinho, paciência e compreensão “... e me ajudou a construir a minha, hoje mais do que nunca...”

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, que sempre foi mais que orientadora... acreditando em mim, e sempre me apoiando em minhas idéias...

A Lu e a Erika que me ensinaram a trabalhar num laboratório de biologia molecular... nossos almoços na Yellow House, no Mc Donald's, as idas ao cinema, os pastéis em Valinhos...

E ainda a Lu, neste último ano, mesmo estando longe, me ajudou a tornar esse trabalho real, com seu apoio e “broncas”.

A Lilli, por nossas conversas, que nunca conseguimos terminar... sempre pronta pra ajudar... Ao Rafa, com seu incentivo para sempre fazer mais uma matéria... Ao Leo, que mesmo sem muito juízo, me fez dar muitas risadas...

A Patty, Cris, Fábio, Marilza, Rodrigo, Claudia, Neide, Elisangela, Isabel, Aline, Estela, Daniela(s), e tantas outras pessoas que não foram citadas, mas que estão nos bastidores da pesquisa e que formam essa grande equipe que é o Laboratório de Genética Molecular da FCM.

Aos Docentes, residentes, alunos de pós-graduação, estagiários que fazem parte do ambulatório. O Dr. Leo sempre pronto a coletar mais uma amostra...

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Buscai, pois, em primeiro lugar, o seu reino e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas. Portanto, não vos inquieteis com o dia de amanhã, pois o amanhã trará os seus cuidados, basta a cada dia o seu mal.”

Mateus 6:33

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxxi</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
1- INTRODUÇÃO	39
1.1- Epidemiologia	41
1.2- Genética da Fibrose Cística	42
1.2.1- Estrutura da proteína.....	43
1.2.2- Funcionamento da proteína CFTR.....	44
1.2.2- Mutações associadas à Fibrose Cística.....	46
1.2.4- Distribuição das mutações no gene CFTR.....	48
1.2.5- Classes de mutações.....	53
1.3- Manifestações Clínicas da Fibrose Cística	54
1.3.1- Sistema Respiratório.....	56
1.3.2- Sistema Digestivo.....	57
1.3.3- Sistema Reprodutor.....	58
1.4- Diagnóstico da Fibrose Cística	59
1.4.1- Teste do suor.....	60

1.4.2- Teste de triagem neonatal.....	60
1.4.3- Triagem populacional e diagnóstico pré-natal.....	61
1.5- Correlação Genótipo-Gravidade da doença.....	62
1.6- Tratamento da Fibrose Cística.....	66
1.7- Fatores Prognóstico na Fibrose Cística.....	66
2- OBJETIVO.....	69
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	73
3.1- Aspectos Éticos.....	75
3.1- Aspectos Éticos.....	75
3.2- Casuística.....	75
3.3- Métodos.....	75
3.3.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	75
3.3.2- Reação em Cadeia da Polimerase.....	76
3.3.3- Digestão enzimática.....	79
3.3.4- Critérios para análise fenotípica.....	83
3.3.5- Escore de Shwachman.....	83
4- RESULTADOS.....	85
4.1- Caracterização da amostra.....	87
4.2- Análise das mutações.....	91

4.2.1- Mutação Δ F508.....	91
4.2.2- Mutação G542X.....	92
4.2.3- Mutação G551D.....	92
4.2.4- Mutação R553X.....	92
4.2.5- Mutação R1162X.....	93
4.2.6- Mutação N1303K.....	93
4.3- Análise fenotípica.....	95
4.4- Escore de Shwachman.....	96
5- DISCUSSÃO.....	99
5.1- Caracterização da amostra.....	101
5.2- Análise das mutações.....	102
5.3- Análise fenotípica.....	104
5.4- Escore de Shwachman.....	105
6- CONCLUSÃO.....	107
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8- ANEXOS.....	125
Anexo 1.....	127
Anexo 2.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

CBAVD	“Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens” – agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes
<i>CFTR</i>	“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator gene”
CFTR	“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator” – Proteína Reguladora da Conductância iônica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EnaC	“Amiloride Sensitive Epithelial Sodium Channel”
FC	Fibrose Cística
Kb	Quilobases
mEq	Mili equivalentes
NFB’s	“Nucleotide-ATP-binding folds”
ORCCs	“Outwardly Rectified Chloride Channels”
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de bases
PI	Pancreático – insuficiente
PKA	Proteína quinase A
PS	Pancreático – suficiente
r. p. m.	Rotações por minuto
TIR	Tripsina imunorreativa

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos.....	41
Tabela 2- Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (DAWSON e FROSSAND, 2000)	51
Tabela 3- Principais mutações associadas a FC, suas frequências e populações onde ocorrem as maiores prevalências (ZIELENSKI e TSUI, 1995)	52
Tabela 4- Frequência da mutação $\Delta F508$ entre pacientes com FC no Estado de São Paulo.....	52
Tabela 5- Manifestações clínicas descritas em 20.096 pacientes com FC, na época do diagnóstico, segundo “CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION” (1997).....	56
Tabela 6- Características clínicas de pacientes FC com fenótipo grave e leve, segundo KEREM e KEREM (1996).....	63
Tabela 7- Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para as mutações da Fibrose Cística.....	77
Tabela 8- Descrição da seqüência dos iniciadores utilizados na PCR dos exons 11, 19 e 21, tamanho dos fragmentos resultantes desta reação e enzimas de restrição específicas.....	78
Tabela 9- Descrição da seqüência dos iniciadores utilizados na PCR do exon 10 e tamanho do fragmento resultante desta reação.....	78

Tabela 10-	Descrição das condições para realização da digestão enzimática para investigação das mutações de Fibrose Cística.....	80
Tabela 11-	Descrição das condições para realização da digestão enzimática para diferenciação das mutações G551D e R553X.....	81
Tabela 12-	Caracterização da amostra quanto ao sexo, cor de pele, manifestação clínica e escore de Shwachman.....	89
Tabela 13-	Prevalência da mutação $\Delta F508$ na amostra avaliada.....	91
Tabela 14-	Prevalência do alelo $\Delta F508$ na amostra analisada.....	91
Tabela 15-	Prevalência do alelo G542X na amostra analisada.....	92
Tabela 16-	Prevalência do alelo R553X na amostra analisada.....	93
Tabela 17-	Prevalência do alelo R1162X na amostra analisada.....	93
Tabela 18-	Prevalência do alelo N1303K na amostra analisada.....	94
Tabela 19-	Distribuição dos genótipos para a mutação da Fibrose cística entre os 70 indivíduos analisados.....	95
Tabela 20-	Relação a manifestação digestiva e o genótipo.....	96
Tabela 21-	Distribuição da gravidade da doença segundo o escore de Shwachman.....	96
Tabela 22-	Relação entre o genótipo e o escore de Shwachman na amostra avaliada.....	97

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
Figura 1- Estrutura do gene CFTR, RNA mensageiro e proteína CFTR (adaptado de http://www.lehigh.edu/~jas0/G19.html).....	43
Figura 2- Estrutura da proteína CFTR (adaptado de ROWNTREE e HARRIS, 2003).....	44
Figura 3- Representação esquemática do funcionamento da proteína CFTR nas glândulas sudoríparas. A figura compara a CFTR normal (parte superior) com a alterada (parte inferior) (TSUI e DURIE, 1997)...	45
Figura 4- Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão (Adaptado de http://www.lclark.edu/~bkbaxter/200lecture/o_and_o/mar_23.htm).....	46
Figura 5- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR (adaptado de FRIZZELL, 1995).....	47
Figura 6- Representação esquemática da mutação F508 da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no exon 10: $\Delta F508$ (Adaptado de WELH e SMITH, 1995)	53
Figura 7- Representação esquemática das cinco classes de mutações conhecidas como causadoras da FC, mostrando sua consequência para a formação da proteína (TSUI e DURIE, 1997)	55

- Figura 8-** Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%: na coluna 1 marcador de peso molecular de 100pb; colunas 1, 7, 8 e 9 indivíduos homozigotos normais – 50pb; colunas 2 e 10 indivíduos homozigotos mutantes – 47pb e colunas 3, 4, 5 e 6 indivíduos heterozigotos – heteroduplex, 47 e 50 pb..... 79
- Figura 9-** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%: na coluna 8 – Marcador de peso molecular de 50pb. Nas colunas de 1 a 7 - detecção da mutação G542X. Na coluna 1 – digestão do produto da PCR – indivíduo heterozigoto – 112 e 90pb; nas colunas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 - digestão do produto da PCR – indivíduos normais - 90pb; nas colunas de 9 a 12 - detecção das mutações G551D e R553X através da digestão com a enzima Hinc II. Nas colunas 9 e 11 - digestão do produto da PCR – indivíduos heterozigotos – 112, 58 e 54pb; nas colunas 10 e 12 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais – 58 e 54pb..... 81
- Figura 10-** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para detecção da mutação R1162X: na coluna 1 – marcador de peso molecular de 50 pb; na coluna 2 - produto da PCR – 454pb; nas colunas 3, 4 e 8 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais - 275 e 179pb; nas colunas 5, 6 e 7 – da digestão do produto da PCR – indivíduos heterozigotos - 275, 179, 143 e 132pb..... 82
- Figura 11-** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para detecção da mutação N1303K: na coluna 1 – marcador de peso molecular de 50 pb; na coluna 2 - produto da PCR – 59pb; nas colunas 3, 4, 5 e 7 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais – 49pb; na coluna 6 – digestão do produto da PCR – indivíduo heterozigoto – 59 e 40pb..... 82

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1- Distribuição dos pacientes portadores de Fibrose Cística segunda a faixa etária.....	87
Gráfico 2- Distribuição dos 70 pacientes portadores de Fibrose Cística segundo o sexo.....	88
Gráfico 3- Distribuição dos 140 alelos de acordo com as mutações estudadas.....	94

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 exons, e é denominado *CFTR* (“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene”). Existem mais de 1.200 mutações descritas em todo o gene, a mais frequente, 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 dos íons cloro. O defeito básico está associado com a diminuição da condução de íons cloro⁻ através da membrana apical de células epiteliais. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de seis mutações em pacientes portadores de Fibrose Cística na região de Campinas e estabelecer associação entre o genótipo e o quadro clínico. A mutação $\Delta F508$, que é a mundialmente mais frequente, foi encontrada em 50% dos 140 alelos analisados nesse estudo. Este dado concorda com os dados da literatura. Em seqüência as outras mutações mais encontradas foram: G542X (4,29%), R1162X (2,14%), N1303K (1,43%) e R553X (0,71%), sendo que a mutação G551D não foi encontrada. Com exceção da G542X que foi encontrada com uma frequência menor do que a descrita na literatura e a G551D que não foi encontrada, as demais mutações estão de acordo com os dados publicados.

Dos 70 indivíduos analisados, somente oito não apresentaram manifestação digestiva. Destes, nenhum possuía a mutação $\Delta F508$ nos dois alelos. Com relação ao escore de Shwachman, apenas um paciente homozigoto para a $\Delta F508$ teve o escore classificado como grave.

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 exons, 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 the prevalence of the six more frequent mutations in patients with Cystic Fibrosis in Brazil and to establish association between the type of mutation and the clinical feature.

Mutation $\Delta F508$, that is the most worldwide frequent one, was found in 50% of the 140 alleles analyzed in this study. This data agree with previously description on the literature. In sequence, the other found mutations were: G542X (4,29%), R1162X (2,14%), N1303K (1,43%) and R553X (0,71%). The G551D mutation was not found. With exception of the G542X mutation, wich was found in a slower frequency than literature, and G551D mutation wich was not found in our sample, the others mutations frequencies are according to the literature data.

Of the 70 analyzed individuals, eight did not present digestive manifestation. Of these none had the $\Delta F508$ mutation in the two alleles. When the Shwachman score was considered, only one homozygous patient for the $\Delta F508$ mutation was classified as severe disease.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia

A Fibrose Cística (FC) acomete aproximadamente 60.000 indivíduos no mundo (GIBSON et al., 2003), apesar da sua incidência variar conforme o grupo étnico em que está presente (Tabela 1) (FITZSIMMONS, 1993; LEWIS e COHEN, 1995; COLONNELLI, 1999). De um modo geral, sua freqüência entre os caucasóides é de 1 para cada 2.500 nascidos vivos. No entanto, em populações asiáticas, a doença é praticamente desconhecida, afetando apenas 1/90.000.

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), porém esse dado pode estar sendo subestimado, pois algumas das manifestações clínicas da doença, são comuns àquelas de outras causas como, por exemplo, o quadro de desnutrição facilmente encontrado em tais regiões, o que permite que se tenha uma falsa idéia de freqüência diminuída.

No Brasil, a freqüência da região sul assemelha-se à da população caucasiana centro-européia que é de 1:2.500. Em outras regiões, a incidência diminui para 1/10.000 nascidos vivos (REIS e DAMACENO, 1988; RASKIN et al., 1993).

Tabela 1- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos.

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 Havaí	1:2.500

1.2- Genética da Fibrose Cística

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. Embora os marcadores mais próximos estivessem a uma 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. As pesquisas para a determinação de sua base genética culminaram na identificação e clonagem do gene em 1989 (ROMMENS, 1989; RIORDAN, 1989; KEREM et al., 1989). Utilizando técnicas de clonagem posicional e salto cromossômico, TSUI et al. (1990) isolaram e mapearam o gene *CFTR* (“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator gene”) no braço longo do cromossomo 7, região 7q3.1. Como descrito por COLLINS (1992), o locus específico do gene *CFTR* contém aproximadamente 250 quilobases de DNA genômico, com 27 exons, que codificam um RNA mensageiro de 6,5 quilobases (Kb) (Figura 1).

O RNA mensageiro produzido pelo gene *CFTR* é transcrito em uma proteína transmembrana de 1480 aminoácidos, com uma massa molecular de 168.138 dáltons, da família das proteínas ATP reguladora de transporte de íons denominada Proteína Reguladora da

Conductância Iônica Transmembrana (*CFTR* – “Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”) (DEVLIN, 1998).

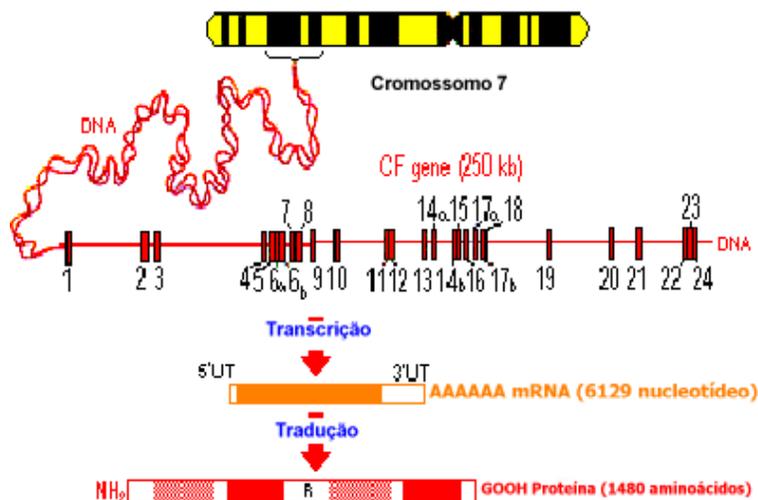


Figura 1- Estrutura do gene *CFTR*, RNA mensageiro e proteína CFTR (adaptado de <http://www.lehigh.edu/~jas0/G19.html>).

1.2.1- Estrutura da proteína

A proteína codificada pelo gene responsável pela doença, a CFTR, é expressa na superfície das células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, constituindo um canal de cloro. (ANDERSON et al., 1991).

A CFTR também está envolvida na regulação do ORCCs (“Outwardly Rectified Chloride Channels”), que contribuem para uma boa condução de íons cloro pelas células, e do EnaC (“Amiloride-Sensitive Epithelial Sodium Channel”) que controla a passagem dos íons sódio.

Em sua estrutura básica, a CFTR é formada por 3 subunidades principais: uma porção hidrofóbica, outra hidrofílica e uma polar. A região hidrofóbica é formada por 2 domínios membranares, constituídos por 6 regiões transmembrana cada, a hidrofílica contém 2 domínios que se ligam à ATP (NFB’s - “nucleotide-ATP-binding folds”) e um domínio regulatório (Figura 2) (DEVLIN, 1998). A ativação da CFTR requer a fosforilação do domínio regulatório pela proteína quinase A (PKA) e hidrólise da ATP nos NFB’s (HAARDT et al., 1999).

Os domínios membranares formam o poro, ou sejam 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 R. Cada domínio possui uma função. O primeiro, que é codificado pelas seqüências encontradas desde o exon 9 até o 12, é responsável pela abertura do canal enquanto o segundo, que é codificado pelas seqüências encontradas desde o exon 19 até o 23, é responsável pelo fechamento deste (ZIELENSKI e TSUI, 1995; WELSH e SMITH, 1993).

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

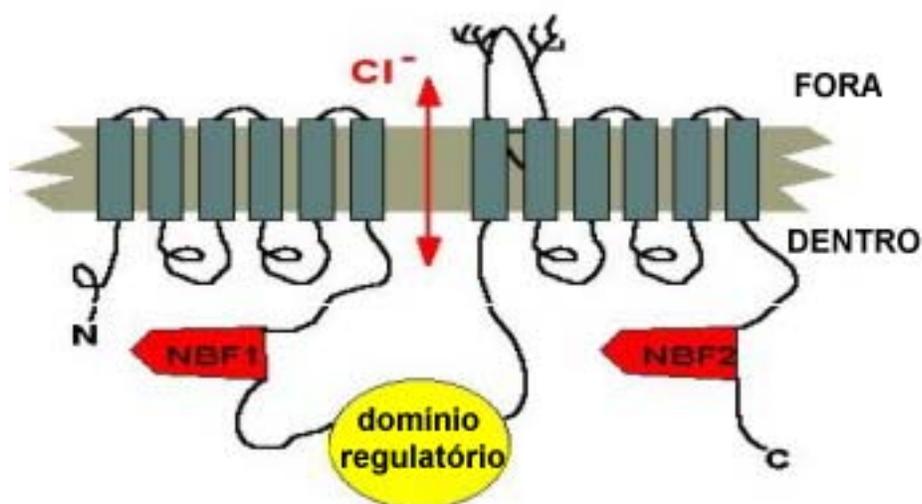


Figura 2- Estrutura da proteína CFTR (adaptado de ROWNTREE e HARRIS, 2003).

1.2.2- Funcionamento da proteína CFTR

As conseqüências da perda de função da proteína CFTR variam de acordo com os tecidos envolvidos. Nas glândulas sudoríparas, a CFTR funciona reabsorvendo o cloro do lúmen da glândula. Quando está 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 3)

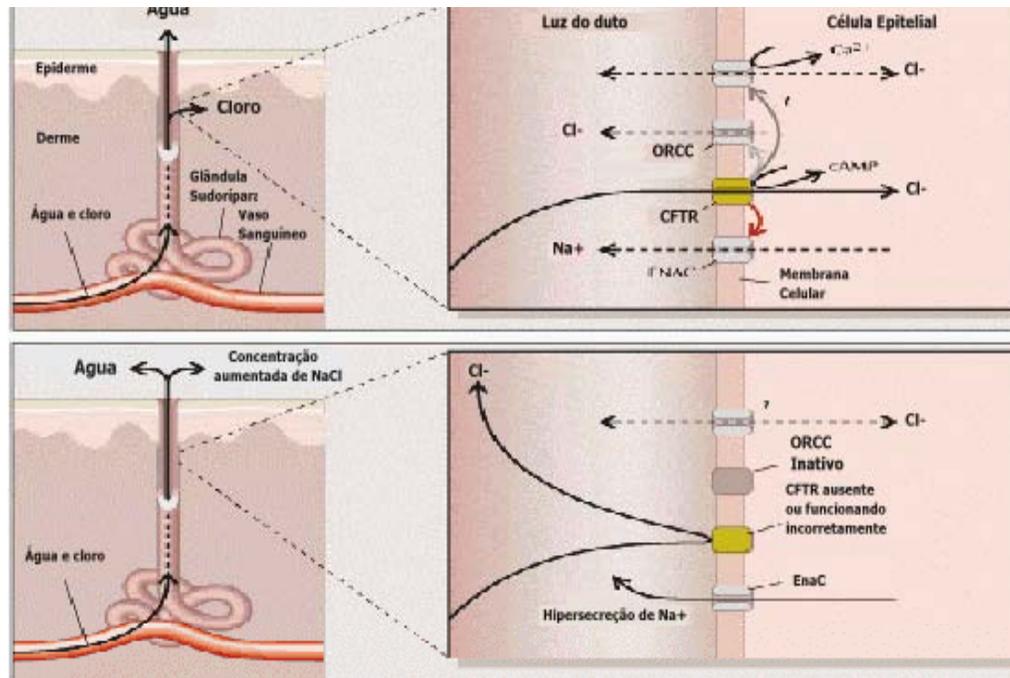


Figura 3- Representação esquemática do funcionamento da proteína CFTR nas glândulas sudoríparas. A figura compara a CFTR normal (parte superior) com a alterada (parte inferior) (TSUI e DURIE, 1997).

Já no pulmão e no pâncreas, a CFTR atua secretando o cloro, e não o reabsorvendo como ocorre nas glândulas sudoríparas (HULL, 2003). Portanto, o funcionamento inadequado da CFTR, 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 preservar o equilíbrio eletroquímico interno da célula (Figura 4) (REIS e DAMACENO, 1993).

A combinação do aumento da reabsorção de sódio e água, através do EnaC, e a diminuição da secreção do íon cloro, pela ausência ou mau funcionamento da CFTR, 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 4- Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão (Adaptado de http://www.lclark.edu/~bkbaxter/200lecture/o_and_o/mar_23.htm).

1.2.3- Mutações associadas à Fibrose Cística

A mutação mais freqüente responsável pela FC é uma deleção nomeada $\Delta F508$. Além desta mutação que contribui com cerca de 70% dos casos da doença, outras mais de 1200 mutações já foram descritas, sendo porém menos freqüentes que a $\Delta F508$. Dentre os tipos de mutações, temos que 42% delas são do tipo mutações de ponto, 23% são inserções e deleções, 16% são de emenda e 15% são sem sentido (Figura 5). Apenas algumas mutações possuem freqüência maior que 1%, embora este valor possa variar de acordo com a população estudada (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

O “European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics” (1990) pesquisou a incidência da mutação $\Delta F508$ na Europa, demonstrando uma variação na frequência da mutação pelo continente, sendo encontrada em 30% dos alelos na Turquia e 88% na Dinamarca. Segundo BOBADILLA et al., (2002), a mutação é encontrada em 70,27% dos alelos no norte da Europa e 50,03% no sul.

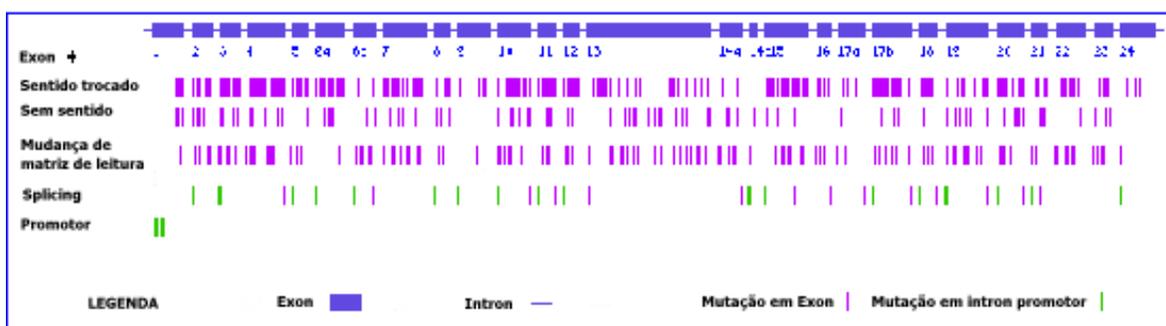


Figura 5- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR (adaptado de FRIZZELL, 1995).

Apesar de ser uma patologia autossômica recessiva, a FC apresenta uma frequência gênica excepcionalmente elevada para uma doença que até a poucos anos era letal, ou seja, os indivíduos afetados não atingiam a idade adulta e portanto não se reproduziam. Muito se tem especulado a esse respeito e uma explicação possível para isso é que esse gene tenha uma taxa de mutação muito elevada ou que os heterozigotos sejam mais adaptados a determinados ambientes. Esta hipótese é chamada de vantagem heterozigótica (NOVAES et al., 2002).

Uma segunda hipótese seria a deriva genética que promove o estabelecimento de alelos mutantes novos numa população e a formação de uma subpopulação pequena por isolamento da população maior da qual se originou. Assim, cada população pode ser caracterizada por suas próprias mutações. Existe ainda a possibilidade da heterogeneidade genética que ocorre quando sintomas clínicos idênticos são causados por defeitos em dois ou mais loci genéticos (NOVAES et al., 2002).

HANSSON (1988) especulou se o defeito no controle dos canais do íon cloro da membrana apical dos pacientes com FC forneceria ao intestino, uma resistência à diarreia provocada por toxinas bacterianas, o que conferiria uma vantagem seletiva para portadores de FC. BAXTER et al. (1988) apresentaram observações reais indicando que o intestino, em homocigotos para FC, não exibe uma resposta secretória na exposição a toxinas bacterianas que induziriam normalmente a uma diarreia. Isto representaria uma outra vantagem seletiva, pois indivíduos com FC seriam resistentes às diarreias provocadas pela secreção de íons cloros. Isto poderia explicar a sobrevivência de crianças heterocigotas e a frequência elevada da doença.

1.2.4- Distribuição das mutações no gene *CFTR*

MORRAL et al. (1994) demonstraram que a mutação $\Delta F508$ ocorreu 52.000 anos atrás em uma população que foi responsável pela disseminação desta. Marcadores genéticos sugerem que a mutação estava presente nos humanos que iniciaram a colonização na Europa há 40.000 anos (STRINGER, 1990).

A mutação $\Delta F508$ corresponde com cerca de 70% dos alelos para FC. Trata-se da deleção das bases, CTT no exon 10 do gene *CFTR*, (KEREM et al., 1989) que leva a perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína resultante (Figura 6), impedindo o seu empacotamento correto e conformação normal. Devido ao seu empacotamento incorreto, ela é reconhecida como anormal e então é degradada sem que possa alcançar a membrana (WELSH e SMITH, 1993).

A distribuição da $\Delta F508$ na Europa possui um gradiente de aumento de sua frequência na direção de sul para o norte europeu (“European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics”, 1990). A análise de marcadores sugere que isso deve ter ocorrido por causa da 1ª disseminação da mutação no período neolítico e também por causa da imigração dos fazendeiros do oeste para o leste europeu (DAWSON e FROSSAUND, 2000).

Assim como facilitou o encontro do gene responsável pela doença, a existência de um haplótipo para a maioria das mutações, também permitiu a associação de algumas mutações.

O desequilíbrio de ligação sugere um efeito fundador, ou seja, existe grande probabilidade da doença ter um ancestral comum (BEAUDET et al., 1989). LIECHTI-GALLATI et al. (1990) observaram que a maioria das mutações causadora da FC é provavelmente resultado de uma mutação ancestral comum, embora também haja uma variação alélica entre os pacientes, o que diferencia as regiões e países.

A G542X, segunda mutação mundialmente mais freqüente, ocorre por uma substituição de uma adenina por uma timina, criando um códon prematuro de parada na posição 1756 do exon 11 (KEREM et al., 1990). LOIRAT et al. (1997) sugeriram que a mutação G542X provavelmente tem origem Fenícia. Eles mostraram que a freqüência de G542X varia entre cidades de origens diferentes, sendo menor em europeus do nordeste do que em europeus do sudoeste. Definiram um mapeamento da mutação G542X pela regressão múltipla de freqüências que cobriu 28 países (53 pontos geográficos) e foi baseada em dados de 50 laboratórios. Valores mais elevados da freqüência desta mutação corresponderam aos locais antigos de ocupação fenícia ocidental.

A terceira mutação mundialmente mais freqüente, a G551D, promove a troca de uma guanina por uma adenina, que substitui o aminoácido glicina por um aspartato, na posição 1784, também no exon 11 (CUTTING et al., 1990). HAMOSH et al. (1991) indicaram que a mutação G551D é a terceira mutação mais comumente associada como causadora da FC, apresentando freqüência global de 3,1%. As regiões com freqüência elevada correspondem às áreas com populações envolvendo maioria de descendência Celta.

Já a quarta mutação mundialmente mais freqüente, a N1303K, é uma substituição de uma citosina por uma guanina na posição 4041 do exon 21, que troca o aminoácido asparagina por uma lisina (OSBORNE et al., 1991). Esta é a quarta mutação mais encontrada com uma freqüência de 1,3%. Sua maior freqüência é encontrada na região mediterrânea e no norte da África e a menor está no sul da Espanha sugerindo que sua introdução na Europa foi pela península ibérica (DAWSON e FROSSARD, 2000).

A sexta mutação mundialmente mais freqüente é denominada R553X. Trata-se da uma substituição de uma citosina por uma timina que cria um códon prematuro de parada da transcrição, na posição 1789 do exon 11 (CUTTING et al., 1990) e a mutação R1162X, é mundialmente a décima colocada, ocorrendo no exon 19 devido à troca de uma adenina por uma guanina na posição 3616, onde é criado um códon prematuro de parada (GAPARINE et al., 1991).

As mutações G542X e N1303K possuem o mesmo haplótipo que a $\Delta F508$, o que sugere que estas mutações tiveram uma mesma origem mutacional. A mutação G542X é a segunda mutação mais encontrada com uma freqüência de 2,4%. Sua menor incidência na Europa é na Espanha (8,8%) enquanto a maior está na Itália (10,9%) (LUCOTTE et al., 1995).

Embora a $\Delta F508$ seja a mutação mais freqüente, sua incidência é variável nas diferentes regiões do mundo (Tabela 2). Na Austrália, a $\Delta F508$ é encontrada em 90% dos indivíduos com FC (GASKIN, 2004); 29% no Chile e 62% na Argentina (STREIT et al., 2003); 69% nos EUA em (BOBADILLA et al., 2002) e 43.5% na Espanha (GÓMEZ-LLOURENT et al., 2001). (Tabela 3).

Tabela 2- Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (DAWSON e FROSSAND, 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

Tabela 3- Principais mutações associadas a FC, suas frequências e populações onde ocorrem as maiores prevalências (ZIELENSKI e TSUI, 1995).

Mutação	Frequência (%)	População com a maior prevalência
$\Delta F508$	66	
G542X	2,4	Espanhóis
G551D	1,6	Ingleses
N1303K	1,3	Italianos
W1282X	1,2	Judeus Askenazi
R1162X	0,3	Italianos

No Brasil, a $\Delta F508$ é encontrada com uma frequência geral de 47% entre os pacientes (PEREIRA et al., 1999), que é muito similar à de Portugal, Espanha e Itália, devido à colonização ocorrida no Brasil por esses países. Deste modo, não sendo a população brasileira etnicamente homogênea, a frequência das mutações neste país varia entre as regiões. Com relação à $\Delta F508$, no Rio de Janeiro foi encontrada em 30% dos cromossomos pesquisados (CABELLO et al., 2001) e no Rio Grande do Sul em 59% (RASKIN et al., 1993). No estado de São Paulo $\Delta F508$ foi descrita por diferentes grupos com frequência variando entre 31.7 e 52% (Tabela 4).

Tabela 4- Frequência da mutação $\Delta F508$ entre pacientes com FC no Estado de São Paulo.

Autor	Nº indivíduos	Frequência alélica (%)
RASKIN et al., 1993	58	52
MARTINS et al., 1993	24	31
PARIZOTTO et al., 1997	60	31.7
BERNARDINO et al., 2000	160	48.4

Deste modo, o presente estudo pesquisou as mutações de FC mais freqüentes na população brasileira, são elas: $\Delta F508$, G542X, G551D, N1303K, R1162X e R553X. Não foi pesquisada a mutação W1282X pois esta é muito freqüente entre Judeus Askenazi, população muito pequena no Brasil. Em compensação foi analisada a mutação R553X de freqüência elevada no norte da Europa e na América, justificando a sua análise em nossa população.

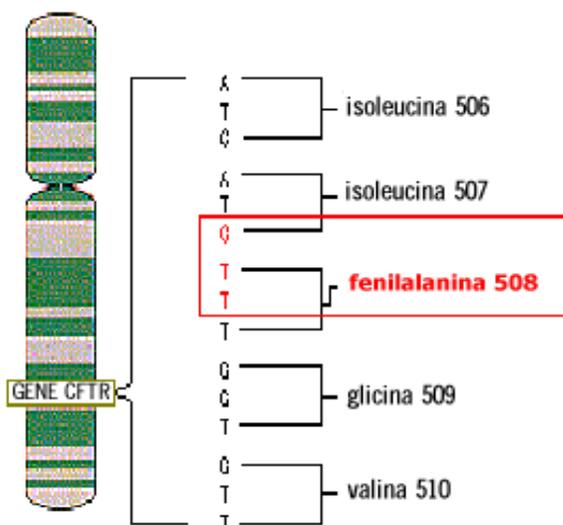


Figura 6- Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no exon 10: $\Delta F508$ (Adaptado de WELH e SMITH, 1995).

1.2.5- Classes de mutações

As mutações da FC foram classificadas em 5 diferentes classes, de acordo com o mecanismo através do qual a proteína CFTR alterada se apresenta (Figura 7) As classes um até a três 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).

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

As mutações da segunda classe alteram os eventos de maturação da proteína, impedindo que esta chegue à membrana e ainda impedem que a proteína assuma sua conformação correta. Faz parte dessa classe a mutação mais freqüente, a $\Delta F508$ (WELSH e SMITH, 1993).

As mutações da classe três afetam o domínio regulatório. Um exemplo dessa classe é a mutação G551D (SALVATORE et al., 2002).

Já as mutações agrupadas nas duas últimas classes estão associadas com alguma secreção de cloro, embora esta represente apenas 10% do normal. 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 temos as mutações R117H e R347P. As mutações de classe V produzem quantidade diminuída de proteína sendo que pequenos níveis funcionais desta são alocados na membrana (ROWNTREE e HARRIS, 2003).

1.3- Manifestações Clínicas da Fibrose Cística

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.

A FC é uma doença essencialmente pós-natal, com poucas manifestações ao nascimento, como íleo meconial e atresia ou amputação intestinal, resultante da secreção anormal de muco. As gestações de crianças com FC são normais assim como o desenvolvimento do feto.

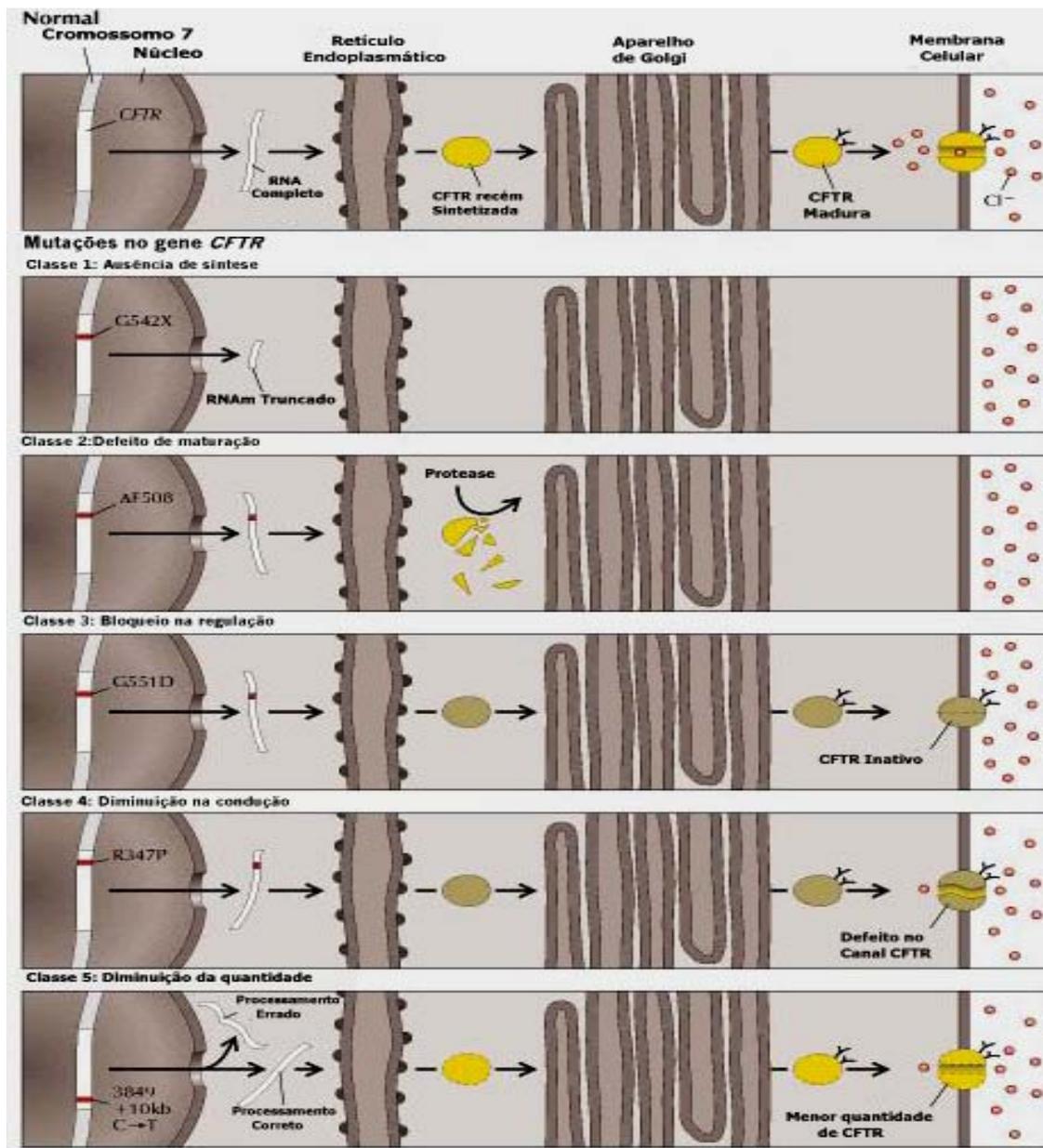


Figura 7- Representação esquemática das cinco classes de mutações conhecidas como causadoras da FC, mostrando sua consequência para a formação da proteína (TSUI e DURIE, 1997).

O fenótipo da FC é complexo, com sintomas respiratórios, gastrointestinais e no aparelho reprodutor, além de níveis elevados de eletrólitos no suor (TSUI, 1995). As manifestações mais frequentes na época do diagnóstico foram descritas por “CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION” (1997) (Tabela 5).

Tabela 5- Manifestações clínicas descritas em 20.096 pacientes com FC, na época do diagnóstico, segundo “CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION” (1997).

Manifestações Clínicas	Número	%
Sintomas respiratórios agudos ou crônicos	10.141	50,5
Desnutrição, baixo ganho pondero-estatural	8.628	42,9
Estreorrréia, fezes anormais	7.024	35,0
Íleo meconial, obstrução intestinal	3.788	18,8
Distúrbios eletrolíticos	1.094	5,4

1.3.1- Sistema Respiratório

Problemas no sistema respiratório ocorrem em 95% dos indivíduos se apresentando de forma progressiva e de intensidade variável (ALVAREZ, 2002). Esta intensidade de acometimento é que determina o prognóstico da doença sendo o envolvimento pulmonar a maior causa de morbidade e mortalidade. 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 bronquectasias, 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* (61%), *Staphylococcus aureus* (28,3%), *Haemophilus influenzae* (8,9%) e *Burkholderia cepacea* (3,2%) (ROBINSON, 2001).

O *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. Isto evolui como uma infecção pulmonar fulminante, freqüentemente fatal, devido à resistência natural elevada deste germe à grande maioria dos antibióticos conhecidos (ALVAREZ, 2002).

1.3.2- Sistema Digestivo

As manifestações clínicas relacionadas ao aparelho digestivo são variáveis. A mais importante e freqüente é 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 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 causada pelas infecções respiratórias de repetição, (REIS e DAMACENO, 1998) que conduzem a um baixo ganho pondero-estatural.

A manifestação mais precoce da FC é a ocorrência do íleo meconial (PARK e GRAND, 1981). O recém-nascido tem dificuldade de eliminar seu material gastrointestinal - mecônio, que acaba por bloquear o intestino. Os sinais de obstrução intestinal podem aparecer dentro de 48 horas após o nascimento. EVANS et al. (2001) 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 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 ilíaca direita. Os sintomas são exacerbados após a alimentação.

1.3.3- Sistema Reprodutor

Agnesia 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 que consiste em uma anormalidade dos ductos reprodutivos, é caracterizada por atrofia, fibrose ou ausência do epidídimo (corpo e cauda), vaso deferente, vesícula seminal e ductos ejaculatórios (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 espermatozóides 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 infertilidade feminina, 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.

1.4- Diagnóstico da Fibrose Cística

A FC é uma doença com diferentes graus de acometimento nos diversos órgãos e com início de manifestação variável. Assim sendo o consenso da “CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION” (1996), propôs algumas características fenotípicas que devem nortear o diagnóstico da doença:

- Doença pulmonar ou sinusal crônica, manifestada por colonização/infecção, alterações persistentes na radiografia de tórax (bronquectasias, atelectasias, opacificações e hiperinsuflação com obstrução das vias aéreas);
- Anormalidades intestinais (íleo meconial, síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal) e pancreáticas;
- Atresia do canal deferente, resultando em azoospermia obstrutiva;
- História familiar de FC;
- Teste positivo de triagem neonatal (dosagem de tripsina imunorreativa).

1.4.1- Teste do suor

Devido à concentração anormal de íons inorgânicos nas secreções das glândulas serosas, uma das manifestações clínicas clássicas da doença é o teor alterado tanto de sódio como de cloro no suor.

Atualmente o procedimento aceitável para a detecção dessa anormalidade é a dosagem quantitativa de cloretos no suor, obtidos pelo método da iontoforese por pilocarpina, método de GIBSON e COOKE (1959). O exame é realizado através da estimulação das glândulas sudoríparas pela aplicação de pilocarpina em área de pele do antebraço, com coleta de suor para iontoforese (ALVAREZ, 2002).

O teste é realizado a partir da quarta semana de vida, já que antes desta há grande dificuldade na obtenção da quantidade mínima de suor, que para a realização do exame é de 100 mg. O resultado é considerado positivo quando a concentração de cloro é maior que 60 mEq/L, o que é encontrado em 95% dos casos. Nos casos duvidosos, o valor encontrado está entre 40 e 60 mEq/L e o exame deve ser repetido. Valores menores que 45 mEq/L são considerados negativos (<http://www.cff.org>). A confirmação diagnóstica requer pelo menos dois exames alterados, colhidos em dias diferentes. Nos casos duvidosos, a confirmação é realizada através da investigação genética, através da determinação das mutações nos dois alelos.

1.4.2- Teste de triagem neonatal

O exame mais utilizado é a dosagem quantitativa da Tripsina Imunorreativa (TIR), baseada no refluxo de enzimas pancreáticas para o sangue, decorrente da obstrução dos ductos.

Este teste deve ser feito na primeira semana de vida, através da coleta de uma gota de sangue do pé da criança. 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 do teste do suor. A confirmação se faz necessária porque há a possibilidade de falsos positivos e/ou negativos.

Através de uma portaria, o Ministério da Saúde, tornou obrigatória a realização da triagem de FC pelo teste do pezinho. Mas, apesar disto, das cerca de três milhões de crianças que nascem no Brasil todo ano, apenas 1,8 milhão têm acesso ao teste (<http://www.genetika.com.br>).

1.4.3- Triagem populacional e diagnóstico pré-natal

Para o grupo de portadores identificados na triagem populacional é indicado o diagnóstico pré-natal. 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 o seu objetivo não seja o de simplesmente detectar anormalidades na idade fetal.

Os seus benefícios incluem: 1) dar opções esclarecidas e corretas aos pais sujeitos a terem um filho com anormalidade; 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 com defeito; e 4) ajudar no tratamento da criança após o nascimento, possibilitando o preparo dos profissionais de saúde que irão cuidar desta.

O diagnóstico pré-natal é realizado através de biópsia de vilosidade coriônica, com posterior análise genética, em torno da 12^a semana de gestação.

Além disso, para se evitar uma segunda gestação de feto afetado pode-se fazer um diagnóstico pré-fecundação e pré-implantação. Estes envolvem fertilização *in vitro* após micromanipulação e biópsia do primeiro corpúsculo polar antes da fertilização ou biópsia do blastômero antes da implantação do pré-embrião, como citado em MOUTOU et al (2002). Após a biópsia do embrião para obtenção de uma ou duas células de uma total de oito e análise genética das células isoladas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) faz-se a implantação (MOUTOU et al, 2002).

1.5- Correlação Genótipo-Gravidade da doença

A apresentação clínica da doença é muito variável (BIENVENUE, 1997), enquanto alguns pacientes morrem muito cedo por causa da ocorrência do íleo meconial ou complicações respiratórias, outros possuem uma forma mais leve e vivem por muitos anos.

A capacidade do genótipo de predizer a gravidade da doença está diretamente relacionada ao órgão acometido. Quando as glândulas sudoríparas, pâncreas e sistema reprodutor são acometidos, existe uma forte correlação entre genótipo e fenótipo. Ao contrário, quando o órgão acometido é o pulmão, há uma grande dificuldade em se estabelecer esta correlação (BARTH, 2004).

MICKLE e CUTTING (2000) descrevem que a mutação $\Delta F508$ em homozigose ou juntamente com outra mutação grave leva ao quadro clássico da FC, ou seja, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência pancreática exócrina, infertilidade masculina e aumento da concentração de cloro no suor.

Estes mesmos autores também observaram, que os pacientes que apresentavam a mutação $\Delta F508$ na sua forma homozigota tinham, em geral, um prognóstico pior, pois esta se associa com insuficiência pancreática, doença pulmonar mais grave e colonização precoce por *P. aeruginosa*.

KEREM e KEREM (1996) publicaram uma Lclassificação para os pacientes FC dividindo-os em dois grupos: fenótipo grave e leve (Tabela 6).

Tabela 6- Características clínicas de pacientes FC com fenótipo grave e leve, segundo KEREM e KEREM (1996).

Características	Fenótipo Grave	Fenótipo Leve
Tipo de mutação	2 mutações graves	Ao menos uma mutação leve
Idade ao diagnóstico	Geralmente < 1 ano	Geralmente < 10 anos
Função pancreática	Insuficiente (95% dos casos)	Suficiente (70% dos casos)
Estado nutricional	Ruim	Bom
Íleo meconial	Alta incidência	Ausente
Níveis de cloro no suor	Altos (> 80mEq/L)	Entre 40 e 80mEq/L
Função pulmonar	Variável	Variável
Fertilidade masculina	Ausente	Possível

KEREM et al. (1990) encontraram que pacientes homocigotos para a mutação $\Delta F508$ tinham sido diagnosticados com FC em uma idade mais precoce, e também observaram que estes tinham frequência maior de insuficientes pancreáticos. Esta característica foi encontrada entre 99% dos pacientes homocigotos, em 72% dos heterocigotos, e em somente 36% dos pacientes com outras mutações.

A mutação G542X em homocigose possui fenótipo variável, desde uma manifestação leve à severa. CASTALDO et al. (1997) descreveram pacientes com uma forma mais severa da doença e foram acometidos logo após o nascimento com o aparecimento do íleo meconial seguido dos sintomas pulmonares e pancreáticos. Entretanto, segundo CUPPENS et al. (1990), a mutação G542X foi responsável por manifestações clínicas moderadas em homocigotos, porém seriam severas em pacientes que apresentassem um genótipo heterocigoto composto para G542X/458 gly-val.

DAWSON e FROSSARD (2000) descrevem a mutação N1303K originando um fenótipo severo principalmente quanto à doença pancreática, mas nenhuma correlação com a manifestação pulmonar pôde ser estabelecida.

A correlação genótipo-fenótipo na manifestação pancreática está bem estabelecida. Foi observado que o paciente que possui uma função pancreática normal, ou seja, são pancreáticos-suficientes (PS), são portadores de pelo menos uma mutação leve (classe IV e V). Já os indivíduos que não possuem uma função pancreática normal, ou seja, são pancreáticos-insuficientes (PI) são portadores de pelo menos uma mutação severa (classes I a III) (ROWNTREE e HARRIS, 2003). Como dito anteriormente, isto ocorre porque as mutações leves permitem com que haja alguma proteína atuante e assim o pâncreas tem uma função residual (KRISTIDIS et al., 1992)

Com relação à função pancreática também é possível fazer uma correlação entre indivíduos de uma mesma família: estes possuem grau semelhante de acometimento (ROWNTREE e HARRIS, 2003). Este achado também se fez presente em um estudo de 7 gêmeos monozigóticos (SANTIS et al., 1992).

A azoospermia por obstrução do canal deferente, secundária a CBAVD, é também uma manifestação clínica de expressão bastante homogênea entre os pacientes com FC. De acordo com PHILLIPSON et al. (2000), dos homens com CBAVD, 60% carregavam uma mutação no gene *CFTR*, 20% eram heterozigotos compostos e 20% não tinham uma mutação identificada neste gene.

Estes casos onde não foi possível identificar nenhuma mutação podem ter uma etiologia diferente. Por exemplo, pacientes com CBAVD e mau formações renais não parecem estar associados com mutações no gene *CFTR* (AUGARTEN et al., 1994).

Estudos têm demonstrado um polimorfismo, IVS8-5T que é uma variação de timinas no intron 8 e está associada a CBAVD. Três alelos diferentes podem ser encontrados apresentando 5, 7, ou 9 repetições (CHU et al., 1991). O alelo com cinco repetições, chamado 5T, está associado a CBAVD (SALVATORE et al., 2002). O número de timinas determina a eficiência do processamento deste intron. Este diminui quanto menor forem os resíduos encontrados. Assim, cadeias menores de timinas determinam a não transcrição do exon 9 e conseqüentemente ocorrem níveis menores de proteína formada (CHU et al., 1991).

BERNARDINO et al. (2003), encontraram essa variante com uma frequência de 23,5% em sua amostra. Este dado está de acordo com o descrito na literatura e confirma a associação da variação com a CBAVD.

A mutação R117H foi descrita por GERVAIS et al. (1993) em 4 de 23 pacientes com CBAVD. Três pacientes eram heterozigotos compostos para R117H e Δ F508, e um era heterozigoto composto para R117H e 2322delG. Nenhum dos 23 pacientes tiveram manifestações pulmonares da FC. BIENVENU et al. (1993) descreveram pela primeira vez um homozigoto para a mutação R117H, um homem de 30 anos de origem francesa estéril devido à CBAVD. Este não apresentava nenhum quadro respiratório ou pancreático e tinha um teste do suor com valores normais.

A relação já bem estabelecida no pâncreas e relativas a mutações leves atenuarem a gravidade da doença digestiva não acontece com a doença pulmonar. Crianças com o mesmo genótipo, mesmo irmãos fraternos (HULL 1993) ou gêmeos mono ou dizigóticos, podem diferir quanto ao quadro pulmonar. BORGIO et al.(1993) comprovaram este dado com um estudo realizado com um par de gêmeos dizigóticos heterozigotos compostos (Δ F508/1717-1G \rightarrow A). Embora a insuficiência pancreática fosse encontrada nos dois a severidade da doença pulmonar foi variável.

Deste modo, conclui-se que a doença pulmonar é influenciada por fatores ambientais, como a idade do paciente, o estado nutricional, exposição ao tabaco, aderência ao tratamento (MAHADEVA e LOMAS, 2000) e também por fatores genéticos como variações em introns e genes moduladores (KEREM e KEREM, 1996).

Assim, a pobre correlação entre genótipo e gravidade da doença pulmonar da FC tem levado à procura de outro gene ou grupo de genes que possam explicar essas variações fenotípicas. Genes que codificam proteínas presentes em outros sistemas, como por exemplo, sistema imunológico, inflamação, reparação do epitélio, transporte de íons pelos canais não-CFTR, poderiam influenciar de forma indireta a gravidade da doença pulmonar (DAVIES, 2003).

1.6- Tratamento da Fibrose Cística

Devido ao caráter multissistêmico da doença, a uma terapia intensa deve ser direcionada por uma equipe multidisciplinar experiente. O tratamento deve ser iniciado precocemente e deve ser individualizado, já que os pacientes não possuem um padrão único de manifestações. O tratamento tem por objetivo retardar as lesões causadas pela doença, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes (ALVAREZ, 2002).

O tratamento do quadro respiratório deve prevenir as lesões pulmonares. O paciente deve se submeter, a programas de fisioterapia respiratória, realizar alguma atividade física regular, além do uso de antibióticos ou drogas orais, como broncodilatadores (BARTH, 2004).

O tratamento da insuficiência pancreática deve ser realizado através da reposição enzimática. As doses devem ser ajustadas individualmente, em função da ingesta calórica de cada paciente, do grau de insuficiência, conteúdo da dieta e apetite do paciente (ALVAREZ, 2002).

Juntamente com o tratamento enzimático, deve-se tratar a deficiência nutricional que é comprometida pela demanda basal aumentada, demanda calórica elevada devido à doença pulmonar e má absorção intestinal. A alimentação deve ser livre, mas com alto teor de gordura e acréscimo de sal (ALVAREZ, 2002).

1.7- Fatores Prognóstico na Fibrose Cística

Já que a doença pulmonar contribui com 95% da mortalidade pela FC, o prognóstico depende grandemente do grau de envolvimento pulmonar. Apesar da deterioração ser inevitável, e poder levar a morte, o prognóstico tem melhorado nas últimas 5 décadas, principalmente por causa do tratamento agressivo da infecção pulmonar. Além disso, a idade de diagnóstico e do tratamento também é fundamental.

Um dos fatores que tem sido apontado por diversos autores como de melhora do prognóstico é o atendimento sistematizado dos pacientes em centros especializados em

FC, como é o caso descrito por COLLINS et al. (1999), que demonstraram um crescimento pondero-estatural normal nos pacientes acompanhados em centros especializados, em contraste com um crescimento deficiente naqueles seguidos fora dos grandes centros.

Hoje com o esclarecimento das pessoas sobre a doença, o prognóstico tem melhorado de forma contínua. Na década de 30, quando a doença foi descrita, 80% das crianças morriam no primeiro ano de vida. Em 1980, a sobrevida aumentou para 20 anos, chegando a 28 na década de 90. Em 2001 alcançava os 32 anos (SANTANA et al., 2003).

Além disso, de acordo com uma análise da “Cystic Fibrosis Foundation”, o número de pacientes acima de 18 anos quadruplicou entre 1969 e 1990. Felizmente esses índices não param de melhorar e considera-se que atualmente a sobrevida dos pacientes com FC tem aumentado a cada ano.

2- OBJETIVO

- Determinar a prevalência das seis mutações ($\Delta F508$, G542X, G551D, R553X, R1162X e N1303K) mais frequentes em pacientes portadores de Fibrose Cística na região de Campinas;
- Estabelecer associação entre o genótipo e o quadro clínico.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (Anexo 1) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.2- Casuística

Foram analisados 70 indivíduos portadores de Fibrose Cística. Deste total, em apenas 52 destes foi possível realizar o Escore Shwachman, que permite avaliar a gravidade do quadro clínico. Para os demais foi possível verificar qual era o tipo de comprometimento que possuíam.

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.

3.3- 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.

3.3.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

Procedemos à extração de DNA conforme o método descrito por WOODHEAD et al. (1986), com algumas modificações.

Dois tubos Vacutainer 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 μ L 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 a centrifuga a 8000 r.p.m. por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395 μ L de tampão de digestão (Tris - HCl pH 7,5 EDTA 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 μ L 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 200 μ L de LiCl 7,5N 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 1mL 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 ressuspenso em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose a 0,8%.

3.3.2- Reação em Cadeia da Polimerase

A análise das mutações no gene *CFTR* foi realizada pela técnica da PCR. (Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês, “Polymerase Chain Reaction”). Esta técnica descrita por MULLINS et al. (1986), 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, onde se hibridizam devido a complementariedade de bases. A reação foi então colocada em um aparelho ciclador de temperatura onde repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento 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 7. Os iniciadores, os tamanhos dos fragmentos, e as enzimas de restrição específicas estão descritos na Tabela 8.

No exon 10 encontra-se a mutação $\Delta F508$, que por se tratar de uma deleção, possibilita analisar o resultado direto da reação da PCR. De acordo com os iniciadores descritos (Tabela 9), o indivíduo normal gera um fragmento de 50pb e o que apresenta a mutação um de 47pb. Os indivíduos heterozigotos, portanto, apresentam fragmentos de 50 e 47pb. Nos heterozigotos aparece ainda uma banda com migração mais tardia, referente aos heteroduplexes, ou seja, fragmentos de DNA formados por uma fita de 47pb e outra de 50pb (Figura 8).

Tabela 7- Concentração dos reagentes utilizados na reação de PCR para as mutações da Fibrose Cística.

Reagentes	Exon 10	Exon 11	Exon 19	Exon 21
	$\Delta F 508$	G542X, G551D e R553X	R1162X	N1303K
DNA (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
Tris-HCl pH 8,4 (10.0 mM)	2.5	2.5	2.5	2.5
KCl (25.0 mM)	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl_2 (1.0mM)	2.0	4.0	1.0	2.0
dNTP (0.025 mM-cada)	1.0	1.0	0.8	2.0
iniciadores (0.2 pMoles-cada)	1.0	1.0	0.8	1.0
Taq polimerase (5 Unidades)	1.0	1.0	1.0	1.0
Água qsp (μL)	25.0	50.0	50.0	50.0
Programas	94°C/5'	95°C/1'	94°C/3'	94°C/5'
	94°C/1'	50°C/1'	94°C/1'	94°C/30''
	52,5°C/1'	74°C/2'	56°C/1'	53°C/30''
	72°C/2'	74°C/9'	72°C/2'	72°C/30''
	72°C/7'		72°C/7'	72°C/7'
Nº Ciclos	35	35	35	35

Tabela 8- Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR dos exons 11, 19 e 21, tamanho dos fragmentos resultantes desta reação e enzimas de restrição específicas.

Exon	Mutação	Sequência 5'- 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Enzima de Restrição
11	G542X	M11e-5: CAgAgAAAgACAATATAgTTCC	112	<i>Bst</i> I
	G551D			<i>Hinc</i> II
	R553X	11i-3B: AAATgCTTgCTAgACCAAT		
19	R1162X	S: gCCCgACAAATAACCAAgTgA AS: gCTAACACATTgCTTCAggCT	454	<i>Dde</i> I
21	N1303K	S: CCACTgTTCATAgggATCCAg AS: AgAAAgTATTTATTTTTTCTggAAC	59	<i>Bst</i> I

Tabela 9- Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR do exon 10 e tamanho do fragmento resultante desta reação.

Exon	Mutação	Sequência 5'- 3'	Tamanho do fragmento (pb) Normal	Tamanho do fragmento (pb) Mutante
10	Δ F508	S: ggC ACC ATT AAA gAA AAT ATC AS: CTA TAT TCA TCA Tag gAA AC	50	47

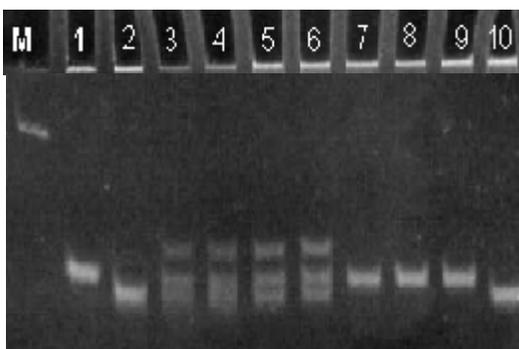


Figura 8- Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%: na coluna 1 marcador de peso molecular de 100pb; colunas 1, 7, 8 e 9 indivíduos homocigotos normais – 50pb; colunas 2 e 10 indivíduos homocigotos mutantes – 47pb e colunas 3, 4, 5 e 6 indivíduos heterocigotos – heteroduplex, 47 e 50 pb.

3.3.3- Digestão enzimática

Para os exons 11, 19 e 21, após a PCR, foi realizada a digestão enzimática específica, segundo orientações do fabricante (tabela 10). Ainda no exon 11, quando detectada a presença de mutações, foi necessária uma segunda digestão enzimática para diferenciar G551D e R553X (Tabela 11).

A análise da mutação G542X no exon 11 utilizou digestão com a enzima *Bstn* I após a PCR. O sítio de restrição para essa enzima foi criado com o auxílio do iniciador modificado M11e-5 e ocorre quando a mutação está ausente. Ou seja, o fragmento de 112pb produzido pela PCR é digerido em dois fragmentos de 90 e 22pb na ausência desta mutação, e permanece com 112 pb na presença desta (Figura 9).

Quando realizada a digestão com a enzima *Bstn* I para detecção das mutações G551D e R553X também localizadas no exon 11, quando a mutação G551D está presente o sítio dessa enzima é suprimido. Entretanto a mutação R553X, por se localizar próxima à mutação G551D, também abole o sítio. Portanto, indivíduos que possuem essas mutações, geram fragmentos de 58 e 54pb. Indivíduos sem essas mutações geram fragmento de 112pb (Figura 9).

Deste modo, a digestão com a enzima *Hinc* II indica a ausência ou a presença destas mutações, porém não especifica qual é. A identificação destas mutações é realizada com uma segunda digestão enzimática utilizando a enzima *Mbo* I. A mutação G551D cria um sítio de restrição que cliva o produto da PCR em 50 e 62pb. Já a mutação R553X não possui sítio de reconhecimento para essa enzima permanecendo com o tamanho da PCR (112pb).

Para a análise da mutação R1162X no exon 19 utilizou-se a enzima *Dde* I. A ausência da mutação cria um sítio de reconhecimento da enzima que cliva o produto da PCR em dois fragmentos de 275 e 179pb. Já a presença da mutação reconhece mais um sítio de restrição que cliva o fragmento de 179 em dois fragmentos, um de 143 e outro de 132pb. Assim, os indivíduos que possuem a mutação apresentam os fragmentos de 179, 143 e 132pb (Figura 10).

Para estudar o exon 21, onde está localizada a mutação N1303K, foi utilizada a enzima *Bstn* I. A presença dessa mutação abole o sítio de reconhecimento desta enzima. Portanto os indivíduos que possuem essa mutação permanecem com o fragmento da PCR (59pb). Já nos indivíduos que não possuem a mutação, a enzima reconhece um sítio específico e cliva o fragmento em fragmentos de 40 e 19pb (Figura.11).

Tabela 10- Descrição das condições para realização da digestão enzimática para investigação das mutações de Fibrose Cística.

Exon	Mutação	Enzima de restrição	Temperatura ótima (°C)	Tamanho do fragmento (pb) Normal	Tamanho do fragmento (pb) Mutante
11	G542X	<i>Bstn</i> I	60	90, 22	112
	G551D	<i>Hinc</i> II	37	58, 54	112
	R553X				
19	R1162X	<i>Dde</i> I	37	275, 179	179, 143, 132
21	N1303K	<i>Bstn</i> I	60	40, 19	59

Tabela 11- Descrição das condições para realização da digestão enzimática para diferenciação das mutações G551D e R553X.

Exon	Mutação	Enzima de restrição	Temperatura ótima (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
11	R553X	<i>Mbo</i> I	37	112
	G551D			62, 50

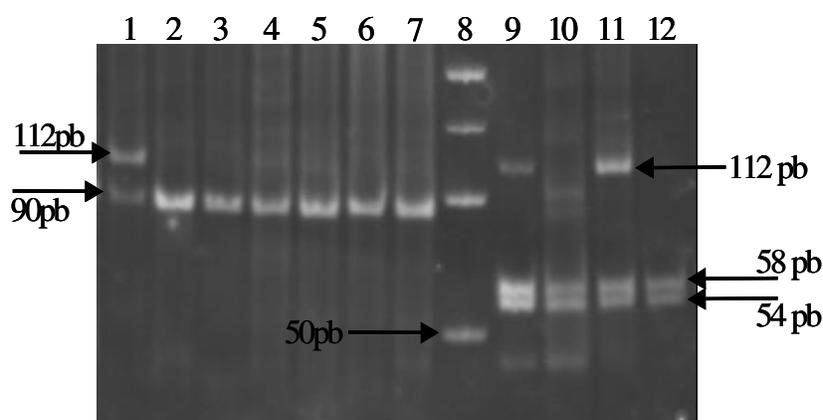


Figura 9- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%: na coluna 8 – Marcador de peso molecular de 50pb. Nas colunas de 1 a 7 - detecção da mutação G542X. Na coluna 1 – digestão do produto da PCR – indivíduo heterozigoto – 112 e 90pb; nas colunas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 - digestão do produto da PCR – indivíduos normais - 90pb; nas colunas de 9 a 12 - detecção das mutações G551D e R553X através da digestão com a enzima *Hinc* II. Nas colunas 9 e 11 - digestão do produto da PCR – indivíduos heterozigotos – 112, 58 e 54pb; nas colunas 10 e 12 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais – 58 e 54pb.

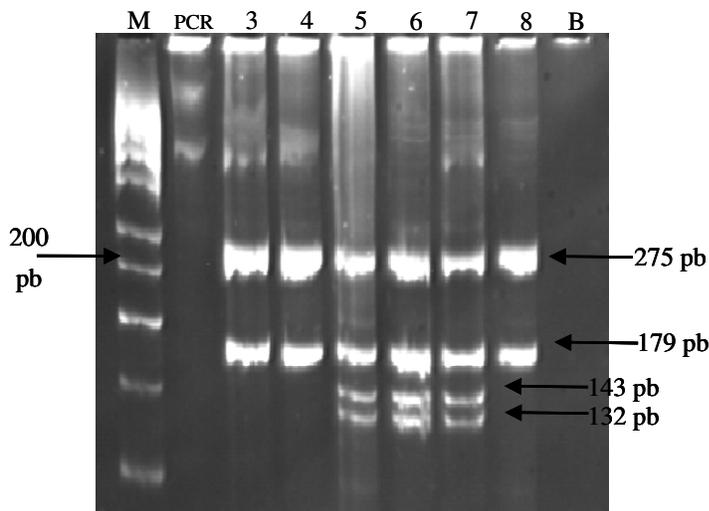


Figura 10- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para detecção da mutação R1162X: na coluna 1 – marcador de peso molecular de 50 pb; na coluna 2 - produto da PCR – 454pb; nas colunas 3, 4 e 8 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais - 275 e 179pb; nas colunas 5, 6 e 7 – da digestão do produto da PCR – indivíduos heterozigotos - 275, 179, 143 e 132pb.

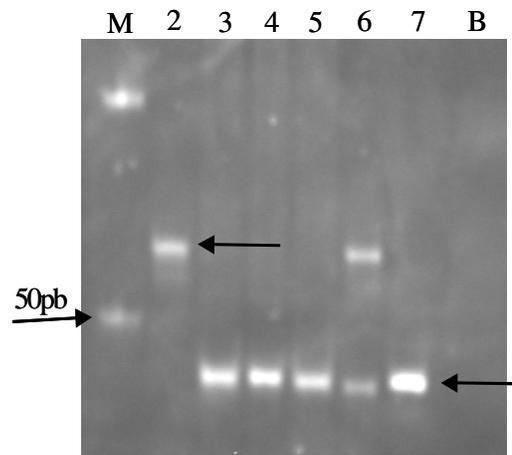


Figura 11- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% para detecção da mutação N1303K: na coluna 1 – marcador de peso molecular de 50 pb; na coluna 2 - produto da PCR – 59pb; nas colunas 3, 4, 5 e 7 – digestão do produto da PCR – indivíduos normais – 49pb; na coluna 6 – digestão do produto da PCR – indivíduo heterozigoto – 59 e 40pb.

3.3.4- Critérios para análise fenotípica

A caracterização do comprometimento pulmonar foi realizada através do exame de função pulmonar com resultado alterado. Já o comprometimento digestivo foi detectado pelo exame de balanço de gordura com resultado alterado.

3.3.5- Escore de Shwachman

Avalia o estado geral dos pacientes correlacionando a nutrição, atividade geral, exames físicos e achados radiológicos (Anexo 2). 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 Escore é graduado em excelente (86-100), bom (71-85), médio (56-70), moderado (41-55) e grave (40 ou menos), conforme o número total de pontos. Os escores originais, excelente e bom tornaram-se grau leve, o escore médio passou a ser grau moderado e os escores moderado e grave foram definidos como grave.

O escore foi avaliado por profissionais do Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Por se tratar de uma análise muito subjetiva, já que se trata de uma análise clínica, tal escore foi realizado por três examinadores diferentes, para tentar diminuir tal subjetividade.

4- RESULTADOS

Foram avaliados 70 indivíduos com diagnóstico confirmado para FC por pelo menos dois resultados alterados em testes de suor. Os genótipos e a avaliação clínica estão resumidos na tabela 12.

4.1- Caracterização da amostra

A idade variou de 2 a 49 anos com média de 12,38 anos e desvio padrão de 9 anos (Gráfico 1).

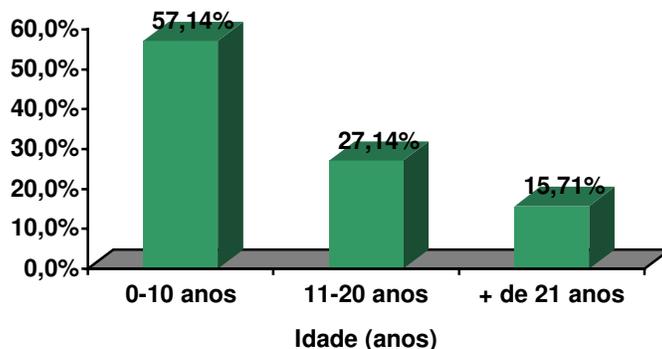


Gráfico 1- Distribuição dos pacientes portadores de Fibrose Cística segundo a faixa etária.

Foram analisados 36 mulheres e 34 homens, ou seja, houve praticamente um equilíbrio na distribuição segundo o sexo, apesar do discreto predomínio do sexo feminino (51,43%) em relação ao sexo masculino (48,57%) (Gráfico 2).

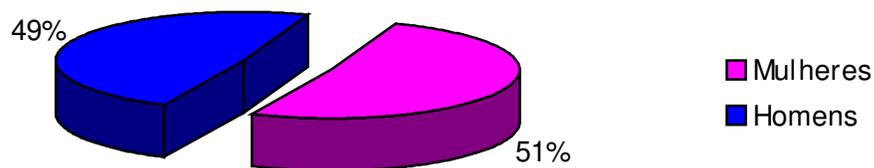


Gráfico 2- Distribuição dos 70 pacientes portadores de Fibrose Cística segundo o sexo.

Como esperado, por se tratar de uma doença com prevalência elevada entre caucasóides, foram encontrados 94,29% na amostra avaliada contra apenas 5,72% de não-caucasóides.

Todos os pacientes apresentaram manifestação respiratória e apenas oito (11,43%) não apresentaram manifestação digestiva.

Tabela 12- Caracterização da amostra quanto ao sexo, cor de pele, manifestação clínica e escore de Shwachman.

Nome	Genótipo	Sexo	Idade	Cor de pele	Comprometimento Respiratório	Comprometimento Digestivo	Escore
A. C. L.	1/X	F	16	Branco	Sim	Sim	Grave
A. G. S.	1/X	M	31	Branco	Sim	Não	Grave
A. X.	1/1	F	10	Branco	Sim	Sim	*****
A. S. B.	X/X	F	14	Branco	Sim	Não	Moderado
A. X.	1/X	F	7	Branco	Sim	Sim	Leve
A. O.	1/1	F	15	Branco	Sim	Sim	Moderado
B. G. M.	1/X	F	3	Branco	Sim	Sim	Leve
B. L. M.	1/X	F	10	Branco	Sim	Sim	Leve
B. S. G.	2/5	F	8	Branco	Sim	Sim	Leve
B. B. K.	1/6	M	18	Branco	Sim	Sim	*****
C. C. M.	1/X	M	9	Branco	Sim	Sim	Moderado
C. A. Q.	1/2	F	3	Branco	Sim	Sim	Leve
D. S. C.	1/X	F	14	Branco	Sim	Não	Grave
E. G.	1/5	F	3	Branco	Sim	Sim	*****
E. V. S. M. S.	1/1	F	5	Pardo	Sim	Sim	Leve
E. R. S.	X/X	M	4	Branco	Sim	Sim	*****
F. A. C.	X/X	M	13	Branco	Sim	Sim	Moderado
F. L.	1/X	M	13	Branco	Sim	Sim	Leve
F. S. P.L	X/X	M	14	Branco	Sim	Sim	*****
G. C. B.	1/X	M	8	Branco	Sim	Sim	Leve
G. G. G.	X/X	F	2	Branco	Sim	Sim	*****
H. B.	1/2	M	18	Branco	Sim	Sim	Grave
I. F. G.	1/1	M	6	Branco	Sim	Sim	*****
I. H. B.	1/X	M	7	Branco	Sim	Sim	Moderado
I. C. S.	1/X	F	7	Branco	Sim	Sim	Leve
I. P. N.	1/4	F	4	Branco	Sim	Sim	Moderado
I. S.	X/X	M	25	Branco	Sim	Sim	*****

Nome	Genótipo	Sexo	Idade	Cor de pele	Comprometimento	Comprometimento	Escore
					Respiratório	Digestivo	
J. C. D. S.	X/X	F	10	Branco	Sim	Sim	Grave
J. D. S.	X/X	M	49	Negro	Sim	Não	*****
J. V. C. A.	1/X	M	3	Pardo	Sim	Sim	*****
J. P. D.	1/1	M	7	Branco	Sim	Sim	Moderado
J. L. R.	X/X	F	9	Branco	Sim	Sim	*****
J. L. R.	X/X	F	4	Branco	Sim	Sim	Moderado
J. V. R. A.	1/X	F	20	Branco	Sim	Sim	Grave
J. C. D. B.	1/X	M	9	Branco	Sim	Sim	Leve
L. H. F.	X/X	M	18	Branco	Sim	Sim	Leve
L. F. S.	1/1	F	7	Branco	Sim	Sim	*****
L. G. L. F.	1/2	F	10	Branco	Sim	Sim	Leve
L. P. O. L.	1/6	F	3	Branco	Sim	Sim	*****
L. S. M.	1/1	M	7	Branco	Sim	Sim	Moderado
L. O. D.	1/1	M	15	Branco	Sim	Sim	Leve
L. F. A.	1/1	M	12	Branco	Sim	Sim	Leve
M. A. B.	1/1	F	10	Branco	Sim	Sim	Grave
M. A. M.	2/X	M	24	Branco	Sim	Sim	Grave
M. M. B.	1/X	M	14	Branco	Sim	Sim	Moderado
M. E. M. Z.	1/1	F	3	Branco	Sim	Sim	Leve
M. A. P.	1/1	M	4	Branco	Sim	Sim	*****
M. L. A.	1/1	M	23	Branco	Sim	Sim	Leve
M. V. G.	1/1	F	6	Branco	Sim	Sim	Moderado
P. C. V. S.	1/X	F	12	Branco	Sim	Sim	Grave
P. H. B. B.	X/X	M	13	Branco	Sim	Não	Leve
P. D. R.	2/X	F	23	Branco	Sim	Não	Leve
R. A. P. O.	1/X	F	8	Branco	Sim	Sim	Moderado
R. S.	1/X	F	13	Branco	Sim	Sim	Moderado
R. S. R.	1/1	M	5	Branco	Sim	Sim	Leve
R. F. L.	X/X	M	32	Branco	Sim	Sim	*****
R. C. G.	X/X	M	12	Branco	Sim	Não	Grave
R. G. G. J.	1/1	M	12	Branco	Sim	Sim	Moderado
R. S. F.	1/X	M	35	Branco	Sim	Sim	*****
R. P.	X/X	F	31	Pardo	Sim	Não	*****
S. R. S.	1/1	F	5	Branco	Sim	Sim	Moderado
T. A. B.	1/5	F	9	Branco	Sim	Sim	Grave
T. S.	X/X	F	6	Branco	Sim	Sim	Moderado
T. M. G.	1/1	M	9	Branco	Sim	Sim	Leve
T. V. P.	X/X	M	22	Branco	Sim	Sim	Grave
V. L. P. C.	1/1	F	7	Branco	Sim	Sim	Leve
V. A. L.	1/1	F	9	Branco	Sim	Sim	Moderado
V. N. F.	1/X	F	9	Branco	Sim	Sim	Grave
V. A. M.	X/X	M	31	Branco	Sim	Sim	*****
Y. B. K.	1/1	M	10	Branco	Sim	Sim	Leve

Legenda: 1: mutação $\Delta F508$; 2: mutação G542X; 4: mutação R553X; 5: mutação R1162X; X: outra mutação;

F: feminino e M: masculino; *****: escore não avaliado.

4.2- Análise das mutações

As mutações: $\Delta F508$ (exon 10); G542X, G551D, R553X (exon 11); R1162X (exon 19) e N1303K (exon 21) foram analisadas nos 70 portadores de Fibrose Cística investigados.

4.2.1- Mutação $\Delta F508$

Dos 70 indivíduos analisados, 21 possuíam outra mutação que não a $\Delta F508$, e 49 possuíam a mutação $\Delta F508$. Destes, 28 eram portadores desta mutação em apenas um dos alelos, enquanto 21 a possuíam nos dois alelos (Tabela 13). A prevalência do alelo $\Delta F508$ nos 140 cromossomos analisados foi de 50% (Tabela 14).

Tabela 13- Prevalência da mutação $\Delta F508$ na amostra avaliada.

Genótipo	Número de indivíduos (%)
$\Delta F508/\Delta F508$	21 (42,86%)
$\Delta F508/X$	28 (57,14%)
X/X	21 (42,86%)
Total	49

Tabela 14- Prevalência do alelo $\Delta F508$ na amostra analisada.

Alelo	Número de cromossomos (%)
$\Delta F508$	70 (50%)
Total de alelos	140

4.2.2- Mutação G542X

Dos 70 indivíduos analisados, 6 possuíam a mutação G542X. A prevalência do alelo na amostra foi de 4,29% (Tabela 15). Todos esses indivíduos possuíam a mutação em apenas um dos alelos. Destes um indivíduo era heterozigoto composto para a mutação G542X e R1162X, três para a G542X e Δ F508 e em dois não foi possível detectar a segunda mutação.

Tabela 15- Prevalência do alelo G542X na amostra analisada.

Alelo	Número de cromossomos (%)
G542X	6 (4,29%)
Total de alelos	140

4.2.3- Mutação G551D

A mutação G551D não foi detectada em nenhum dos indivíduos testados.

4.2.4- Mutação R553X

Dos 70 indivíduos analisados, em apenas um foi possível detectar a mutação R553X. A prevalência do alelo na amostra foi de 0,71% (Tabela 16). Este indivíduo era heterozigoto composto com a mutação Δ F508.

Tabela 16- Prevalência do alelo R553X na amostra analisada.

Alelo	Número de cromossomos (%)
R553X	1 (0,71%)
Total de alelos	140

4.2.5- Mutação R1162X

Dos 70 indivíduos analisados, 3 possuíam a mutação R1162X. A prevalência do alelo na amostra foi de 2,14%(Tabela 17). Todos esses indivíduos possuíam a mutação em apenas um dos alelos. Destes um indivíduo era heterozigoto composto com a mutação G542X e outro com a mutação Δ F508.

Tabela 17- Prevalência do alelo R1162X na amostra analisada.

Alelo	Número de cromossomos (%)
R1162X	3 (2,14%)
Total de alelos	140

4.2.6- Mutação N1303K

Dos 70 indivíduos analisados, 2 possuíam a mutação N1303K. A prevalência do alelo na amostra foi de 1,43%(Tabela 18). Todos esses indivíduos possuíam a mutação em apenas um dos alelos, e eram heterozigotos compostos com a mutação Δ F508.

Tabela 18- Prevalência do alelo N1303K na amostra analisada.

Alelo	Número de cromossomos (%)
N1303K	2 (1,43%)
Total de alelos	140

Em apenas 18 indivíduos não foi detectada nenhuma das mutações estudadas, permanecendo portanto o diagnóstico baseado somente nos valores do teste do suor alterados (Gráfico 3). Para os outros indivíduos foi detectada pelo menos um alelo com uma das mutações pesquisadas (Tabela 19).

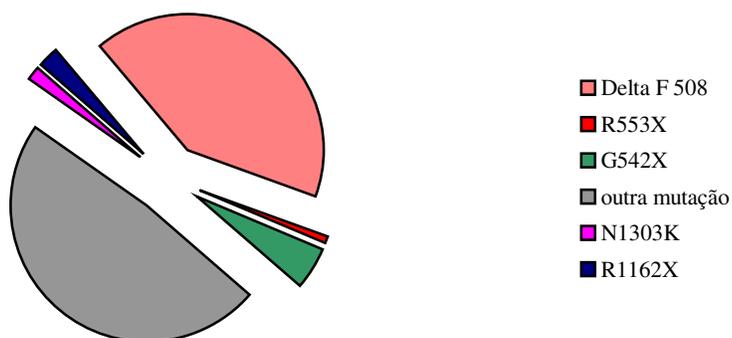


Gráfico 3- Distribuição dos 140 alelos de acordo com as mutações estudadas.

Tabela 19- Distribuição dos genótipos para a mutação da Fibrose cística entre os 70 indivíduos analisados.

Genótipo	Número de pacientes
$\Delta F508/\Delta F508$	21
$\Delta F508/X$	20
$\Delta F508/G542X$	3
$G542X/R1162X$	1
$G542X/X$	2
$\Delta F508/R553X$	1
$\Delta F508/R1162X$	2
$\Delta F508/N1303K$	2
X/X	18
Total	70

Legenda: X: outra mutação

4.3- Análise fenotípica

Dos 70 indivíduos analisados apenas oito não apresentavam a manifestação digestiva, enquanto a respiratória foi encontrada em todos.

Destes oito pacientes que não possuíam manifestação digestiva, dois deles eram heterozigotos compostos para a mutação $\Delta F508$, e os demais não possuíam esta mutação (Tabela 20).

Tabela 20- Relação a manifestação digestiva e o genótipo.

Genótipo	Não (%)	Sim (%)	Total
Outra mutação/ Outra mutação	5 (62,5)	13 (20,97)	18
ΔF508/Outra mutação	2 (25)	18 (29,03)	20
ΔF508/ΔF508	0	21 (33,87)	21
ΔF508/-	0	8 (11,43)	8
G542X/-	1 (12,5)	2 (3,23)	3
Total	8	62	70

Legenda: -: nenhum das 6 mutações analisadas

4.4- Escore de Shwachman

Dentre os 70 indivíduos cujos genótipos foram determinados, somente em 52 foi possível realizar o escore (tabela 21). A relação do escore e a mutação ΔF508 estão descritas na tabela 22.

Tabela 21- Distribuição da gravidade da doença segundo o escore de Shwachman.

Escore	Número de indivíduos (%)
Leve	22 (42,3%)
Moderado	17 (32,7%)
Grave	13 (25%)
Total	52

Tabela 22- Relação entre o genótipo e o escore de Shwachman na amostra avaliada.

Escore	Grave (%)	Moderado (%)	Leve (%)	Total
Mutação				
Outra mutação/ Outra mutação	3 (23,08)	2 (9,09)	4 (23,53)	9
Δ F508/ Outra mutação	6 (46,15%)	7 (31,82%)	5 (29,41%)	18
Δ F508/ Δ F508	1 (7,69%)	9 (40,91%)	7 (41,18%)	17
Δ F508/-	2 (15,38)	2 (9,09)	1 (5,88)	5
G542X/-	1 (7,69%)	2 (9,09)	0	3
Total	13	22	17	52

Legenda: X: nenhuma das 6 mutações

5- DISCUSSÃO

É sabido que o diagnóstico molecular da FC é extremamente trabalhoso frente à heterogeneidade molecular da alteração, deste modo, em muito pacientes não é possível concluir o diagnóstico molecular. Por essa razão este presente estudo teve como objetivo principal estabelecer a prevalência das principais mutações que conduzem ao quadro clínico característico da FC.

5.1- Caracterização da amostra

Quanto à distribuição da idade houve um predomínio de uma população mais jovem, com uma média de idade de 12,38 anos e um desvio padrão de 9 anos. Quando foi realizada uma distribuição por faixas etárias, pode-se perceber que a maioria dos pacientes (57,14%) encontrava-se na faixa de zero a dez anos, enquanto 42,85% destes tinham mais de 10 anos.

Em um estudo realizado por MARÓSTICA et al. (1998), a distribuição da idade variou de 4 meses a 17 anos com 73,77% dos seus pacientes na faixa de zero a dez anos, e somente 26,23% tinham mais de 10 anos. Esse estudo foi realizado em Porto Alegre onde analisaram 61 indivíduos com FC diagnosticados através da realização de dois testes do suor que apresentaram resultados alterados.

Com relação ao sexo, foi observada distribuição relativamente uniforme, com 51% de mulheres e 49% de homens. Porém, ao contrário do nosso estudo, a literatura descreve um discreto predomínio do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Este predomínio também foi encontrado por STREIT et al. (2003) que descreveram uma prevalência de 61% para os homens, enquanto apenas 39% para as mulheres. MARÓSTICA et al. (1998), também descreveram o sexo masculino (62,3%) com uma prevalência maior do que o feminino (37,7%). Se levarmos em consideração que a FC é uma doença autossômica recessiva, não deveria haver predomínio de nenhum sexo. Sendo assim, nos estudos em que isso ocorre deve haver um viés de averiguação.

A incidência elevada de pacientes da raça caucasóide nesta amostra (94,29%) está de acordo com os dados da literatura que demonstram uma incidência baixa de FC entre não-caucasóides. Em nosso meio DOMEK ESPINOZA (1998) encontrou a FC em 94% de caucasóides sendo investigados 32 indivíduos com mais de 15 anos. MARÓSTICA et al. (1998) em estudo realizado no Rio Grande do Sul descreveram, em uma amostra de 61 pacientes, que 100% destes eram caucasóides. Isto se deve ao tipo de colonização ocorrida neste estado que foi predominantemente de imigrantes do sudeste Europeu. Entretanto, SANTANA et al. (2003), em seu estudo de 69 indivíduos no estado da Bahia encontrou uma maioria (71,3%) de não-caucasóides. Esse achado deve ser resultado do forte componente imigratório africano ocorrido naquele estado.

5.2- Análise das mutações

Dos 140 alelos analisados a mutação $\Delta F508$ foi encontrada em 50%. STREIT et al. (2003), em sua análise de 154 alelos analisados para esta mutação em Porto Alegre – Brasil, descreveram a $\Delta F508$ com uma frequência de 48,7% ($\chi^2=0,05$; $P=0,82$). RASKIN et al. (1993) em amostra do estado de São Paulo descreveram a mutação $\Delta F508$ em 47% dos 116 alelos analisados ($\chi^2=0,17$; $P=0,68$). CABELLO et al. (2001) verificaram a presença da mutação $\Delta F508$ em 25,68% dos 148 alelos analisados provenientes do estado do Rio de Janeiro ($\chi^2=18,16$; $P=0,00002$). OKAY et al. (2005) em uma população de 108 indivíduos do estado de São Paulo detectou esta mutação em 44,45% dos alelos analisados ($\chi^2=0,75$; $P=0,38$). ARAÚJO et al. (2005) em estudo realizado em Belém, descreve a mutação $\Delta F508$ com uma frequência de 22,7% nos 66 alelos analisados ($\chi^2=13,77$; $P=0,0002$).

Só foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($\chi^2(5)=34,41$; $P=0,00000197$) em relação aos resultados de CABELLO et al. (2001) e ARAÚJO et al. (2005). Isto deve ter ocorrido pela diferença no tipo de grupo étnico encontrado nesses estados. No Rio de Janeiro há uma prevalência de 26% de caucasóides, no Pará são 55% e em São Paulo 70,70%.

Com relação à frequência genotípica, temos que a mutação $\Delta F508$ em homozigose foi encontrada em 42,86% dos indivíduos analisados. STREIT et al. (2003) dos 77 indivíduos analisados observaram este genótipo em 31,2% destes, enquanto CABELLO et al. (2001) encontraram em somente 10,81%. Já os indivíduos que possuem esta mutação em apenas um dos alelos, foram encontrados por nós em 57,14%, valor bem maior do que o descrito por STREIT et al. (2003) (28,6%) e CABELLO et al. (2001) (22,97%). OKAY et al. (2005) encontrou os homozigotos $\Delta F508$ em 21,3% dos indivíduos analisados em os heterozigotos em 46,3%.

Em nossa casuística, a prevalência da mutação G542X foi de 4,29%. STREIT et al. (2003) e CABELLO et al. (2001) encontraram essa mutação com uma frequência de 3,2% ($\chi^2=6,22$; $P=0,63$) e 2,7% ($\chi^2=0,54$; $P=0,46$), respectivamente. Já RASKIN et al. (1999), em um estudo realizado em 5 estados brasileiros, descreveram a mutação G542X com uma frequência geral de 5,5%, entre 247 alelos analisados ($\chi^2=11,91$; $P=0,00055$). Somente com relação ao estudo de RASKIN et al. (1999) foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2(3)=26,90$; $P=0,00000619$).

A mutação G551D, terceira mutação mundialmente mais freqüente (1,6%), não foi detectada na amostra avaliada. RASKIN et al. (1999), encontraram esta mutação em apenas um dos alelos analisados (1,8%) ($\chi^2=2,51$; $P=0,11$). A incidência diminuída dessa mutação na população brasileira se deve ao tipo de colonização ocorrida no país. Esta mutação possui sua maior frequência nas regiões de ocupação celta da Europa. Como o Brasil foi colonizado preferencialmente por imigração do mediterrâneo, onde essa população é pequena, a frequência dessa mutação é menor no país.

A mutação R553X possui uma frequência mundial de 1,6% (“Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium” 1994). Neste estudo foi encontrada em 0,71% dos 140 alelos analisados. STREIT et al. (2003) descreve essa mutação com uma frequência de 0,7% ($\chi^2=0,01$; $P=0,93$) e RASKIN et al. (1999) de 0,8% ($\chi^2=4,31$; $P=0,037$). Assim só encontrada diferença estatisticamente significativa com relação ao estudo de RASKIN et al. (1999) ($\chi^2(2)=7,37$; $P=0,025$).

A mutação R1162X foi detectada em 2,4% dos alelos estudados, sendo valor semelhante ao encontrado no estado do Paraná. Dos 98 alelos analisados apenas um (1,02%) apresentou a mutação (PEREIRA et al., 1999) ($\chi^2=0,44$; $P=0,50$). Todavia, esses mesmos autores descrevem essa mutação no estado de Santa Catarina em 6 dos 60 alelos analisado (10%) ($\chi^2=6,03$; $P=0,014$). Esta diferença deve ocorrer pelo tipo de colonização basicamente do nordeste da Itália que ocorreu em Santa Catarina, onde esta mutação é a segunda mais freqüente (BOBADILLA et al., 2002). Assim só foi encontrada diferença estatisticamente significativa com relação ao estudo a Santa Catarina ($\chi^2(2)=10,45$; $P=0,0053$).

A sexta mutação analisada, a N1303K, foi encontrada em 1,43% dos 140 alelos analisados. RASKIN et al. (1999) ($\chi^2=2,22$; $P=0,13$) e STREIT et al. (2003) ($\chi^2=0,81$; $P=0,36$) não identificaram essa mutação na amostra avaliada.

5.3- Análise fenotípica

Dos 70 indivíduos analisados somente oito não apresentaram quadro clínico de alteração digestiva. Destes nenhum apresentou a mutação $\Delta F508$ em homozigose e apenas dois tinham um alelo $\Delta F508$, em cinco não foi detectada nenhuma das mutações estudadas e um indivíduo possuía a mutação G542X em um alelo. O teste exato de fisher indicou um valor de $|P=0,0256$.

A ausência do genótipo $\Delta F508/\Delta F508$ está de acordo com a literatura, pois esta mutação é classificada como responsável por um fenótipo grave, ou seja, os indivíduos que possuem dois alelos têm manifestação respiratória e digestiva (MICKLE e CUTTING, 2000). Segundo ROWNTREE e HARRIS (2003), a presença de uma mutação leve no outro alelo modula o efeito da mutação $\Delta F508$, isto é, como essas mutações permitem que alguma proteína alcance a membrana celular, então o transporte de íons cloro não fica totalmente comprometido.

5.4- Escore de Shwachman

Em nossa amostra 42,3% dos 70 pacientes apresentaram escore classificado como leve e somente 25% como grave. O teste exato de Fisher indicou um valor de $p=0,03652$. MARÖSTICA et al. (1998), em uma amostra de 61 indivíduos encontraram 86,88% de escore leve e apenas 6,56% apresentavam moderado ou grave. DOMEZ ESPINOZA (1998), em uma população maior de 15 anos, relatou que 55% apresentavam escore bom e 41% moderado ou grave. A maior gravidade, neste caso, decorre provavelmente, por se tratar de uma população de idade mais avançada.

Embora a relação da mutação $\cdot F508$ e a gravidade da doença esteja bem estabelecida, quando realizamos a correlação entre esta mutação e o escore de Shwachman na nossa amostra, encontramos que apenas 1,92% dos indivíduos investigados homocigotos para essa mutação tiveram o escore classificado como grave, contra 23,08% de escore grave entre pacientes que possuem duas mutações não diagnosticadas.

Algumas hipóteses podem ser formuladas a esse respeito. Não podemos descartar a ação de genes modificadores. Não se sabe ao certo qual seria a exata ação desses genes, mas eles devem modular o fenótipo gerado pela mutação no gene principal. Estes genes poderiam tanto piorar o quadro clínico, como também amenizá-lo. Assim, o quadro clínico de cada paciente dependeria não somente do tipo, ou de qual mutação, mas também de qual e de como os genes modificadores estariam interagindo.

Quando foi realizada a regressão logística com correção pela idade, pode-se observar que não houve influência do genótipo na gravidade da doença. Já na correlação entre a idade e o quadro clínico foi encontrado que quanto maior a idade, mais severa apresentação clínica.

6- CONCLUSÃO

As conclusões que chegamos através desse estudo foram:

- A efetividade de diagnóstico analisando essas seis mutações mais prevalentes foi de 58,57%
- A mutação $\Delta F508$ foi encontrada em 50% dos alelos, a G542X em 4,29%; a R553X em 0,71%, a R1162X em 2,14%; a N1303K em 1,43% e a G551D não foi detectada na amostra avaliada; Em nossa amostra o Escore de Shwachman tendeu a leve;
- Na relação entre o Escore de Shwachman e a mutação $\Delta F508$, os pacientes $\Delta F508/\Delta F508$ tiveram, em sua maioria, escore classificado como leve e moderado;
- Dos 70 indivíduos analisados apenas oito não possuíam manifestação digestiva, sendo que nenhum deles foi portador da mutação $\Delta F508$ em homozigose;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre o genótipo CFTR e a gravidade da doença.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ A. E. 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. 2002.147 f. Tese (Dissertação de Mestrado)- Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ANDERSON, M. P.; GREGORY, R. J.; THOMPSON, S.; SOUZA, D. W.; PAUL, S.; MULLIGAN, R. C. et al.- Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. **Science**, 253, 202-205, 1991.

ARAÚJO, F. G.; NOVAES, F. C.; DOS SANTOS, N. P. C.; MARTNS, V. C.; SOUZA DE, S. M.; DOS SANTOS, S. E. B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K. C. Prevalence of $\Delta F508$, G551D, G542X and R553X mutations among cystic fibrosis patients in north of Brazil. **Braz. J. of Medical and Biol. Reser.**, 38: 11-15, 2005.

AUGARTEN, A.; YAHAV, Y.; KEREM, B. S.; HALLE, D.; LAUFER, J. Congenital bilateral absence of vas deferens in absence of cystic fibrosis. **Lancet**, 344: 1473-74, 1994.

BARTH, L. R. Perfil microbiológico e fatores de gravidade de pacientes com fibrose cística. 2004. 140f. Tese (Dissertação de Mestrado)- Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BAXTER, P. S.; GOLDHILL, J.; HARDCASTLE, J.; HARDCASTLE, P. T.; TAYLOR, C. J. Accounting for cystic fibrosis. (Letter) **Nature**, 335: 211, 1988.

BEAUDET, A. L.; FELDMAN, G. L.; FERNBACH, S. D.; BUFFONE, G. J.; O'BRIEN, W. E. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis, and genetic counseling. **Am. J. Hum. Genet.**, 44: 319-26, 1989.

BEDROSSIAN, C. W. M.; GREENBERG, S. D.; SINGER, D. B. The lung in cystic fibrosi: a quantitative study including prevalence of pathological finding among different age groups. **Hum. Patol.**, 7: 196, 1976.

BERNARDINO, A. L.; FERRI, A.; PASSOS BUENO, M. R. Molecular analysis in brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. **Genet. Test**, 4(1): 69-74, 2000.

BERNARDINO, L. F.; LIMA, C. E.; ZATS; M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. **Genet. Molec. Biol.**, 26 (1): 1-3, 2003.

BIENVENU, T.; BELDJORD, C.; ADJIMAN, M.; KAPLAN, J. C. Male infertility as the only presenting sign of cystic fibrosis when homozygous for the mild mutation R117H. (Letter) **J. Med. Genet.**, 30: 797, 1993.

BIENVENUE, T. Molecular basis of phenotype heterogeneity in cystic fibrosis. **Ann. Biol. Clin.**, 55:113-21, 1997.

BOBADILLA, J. L.; MACEK, M. J.; FINE, J. P.; FARRELL, P. M. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of cftr mutations – correlation with the incidence data and application to screening. **Hum. Mutat.**, 19: 575-606, 2002.

BORGIO, G.; CABRINI, G.; MASTELLA, G.; RONCHETTO, P.; DEVOTO, M.; ROMEO, G. Phenotypic intrafamilial heterogeneity in cystic fibrosis. **Clin. Genet.**, 44: 48-9, 1993.

CABELLO, G. M. K.; CABELLO, P. H.; LLERENA JR., J.; FERNADES, O.; HARRI, A. The 3120+1g a splicing mutation in cftr is comun in brazilian cystic fibrosis patients. **Hum. Biol.**, 73: 403-09, 2001.

CASTALDO, G.; RIPPA, E.; SALVATORE, D.; SIBILLO, R.; RAIA, V.; RITIS, et al. Severe liver impairment in a cystic fibrosis-affected child homozygous for the G542X mutation. **Am. J. Med. Genet.**, 69: 155-58, 1997.

Central de aconselhamento e laboratório de genética. Disponível em: <http://www.genetika.com.br>. Acesso em: 20 de janeiro de 2005.

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

CHU, C.-S.; TRAPNELL, B. C.; MURTAGH, J. J. JR.; MOSS, J.; DALEMANS, W.; JALLAT, S. et al. Variable detection of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. **EMBO J.**, 10: 1355-63, 1991

COLLINS, C. E.; MACDONALD-WICKS, L.; ROWE, S.; O'LOUGHLIN, E. V.; HENRY, R. L. Normal growth in cystic fibrosis associated with specialised center. **Arch. Dis. Child.**, 81(3): 241-46, 1999.

COLLINS, F. S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. **Science**, 256: 774-79, 1992.

COLONNELLI, G. Fibrose Cística: Estudo da mutação $\Delta F508$ e dos marcadores genéticos XV2 e KM 19 em afetados e na população de Belém. 1999. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, UFPA, Belém-PA, 1999.

CUPPENS, H.; MARYNEN, P.; DE BOECK, C.; DE BAETS, F.; EGGERMONT, E.; VAN DEN BERGHE, H. et al. A child, homozygous for a stop codon in exon 11, shows milder cystic fibrosis symptoms than her heterozygous nephew. **J. Med. Genet.**, 27: 717-19, 1990.

CUTTING, G. R.; KASCH, L. M.; ROSENSTEIN, B. J.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.-C.; ANTONARAKIS, S. E. et al. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. **Nature**, 346: 366-69, 1990.

CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM- CFGAC. The Cystic fibrosis mutation database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. Acesso em 23 de janeiro de 2005.

DAVIES, J. C. Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. **Paediatric Respiratory Reviews.**, 3: 128-34, 2003.

DAWSON, K. P.; FROSSARD, P. M. The geografic distribution of cystic fobrosis mutations gives clues about population origins. **Eur. J. Pediatr.**, 159: 496-99, 2000.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlação clínica**, 4ªed., São Paulo, SP: Ed. Edgar Bluicher LTDA, 1998.

DOMEC ESPNOZA, M. P. S. Fibrose cística entre jovens e adultos do hospital das clínicas da Unicamp.1998. tese (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

EUROPEAN WORKING GROUP. **Hum. Genet.** 85: 39-454, 1990.

EVANS A. K.; FRITZGERALD, D. A. & MCKAY, K. O.- The impact of the meconius ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. **Eur. Resp. J.**, 18(5): 784-89, 2001.

FEUILLET-FIEUX, M. N.; FERREC, M.; GIGAREL, N.; THUILLIER, L.; SERMET, I.; STEFFAN, J.; et al. Novel cftr mutations in black cystic fibrosis patients. **Clin. Genet.**, 65: 284-87, 2004.

FITZSIMMONS, S. C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, 122: 1-9, 1993.

FRIZZELL, R. A. Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, 151: S54-8, 1995.

GASKIN, J. K. Genetic disorders in gastroenterology and hepatology. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 19: 228, 2004.

GASPARINI, P.; NUNES, V.; SAVOIA, A.; DOGNINI, M.; MORRAL, N.; GAONA, A. et al. The search of Southern European cystic fibrosis mutations: Identification of two new mutations, four variants, and intron sequences. **Genomics**, 10: 193-200, 1991.

GERVAIS, R.; DUMUR, V.; RIGOT, J.-M.; LAFITTE, J.-J.; ROUSSEL, P.; CLAUSTRES, M. et al. High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. (Letter) **New Eng. J. Med.**, 328: 328-29, 1993.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of eletrolytes in sweat in CF of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics.**, 23: 545-49, 1959.

GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B. W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**; 168: 918-51,2003.

GILLJAM, M.; ANTONIOU, M.; SHIN, J.; DUPUIS, A., COREY, M.; TULLIS, D. E. Pregnancy in cystic fibrosis. Fetal and maternal outcome. **Chest**, 118(1): 85-91, 2000.

GÓMEZ-LLOURENT, M. A.; SUAREZ, A.; GÓMEZ-LLOURENT, MUÑOZ, A.; ARAUZO, M.; ANTUNES, A. et al. Analysis of 31 CFTR mutations in 55 families from the south of spain. **Early Hum. Dev.** 65 (supl) S161-164, 2001.

HAARDT, M.; BENHAROUGA, M.; LECHARDEUR, D.; KARTNER, N.; LUKACS, G. L. C. Terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis: a novel class of mutation. **J. Biol. Chem.**, 274: 21873-77, 1999.

HAMOSH, A.; KING, T. M.; ROSENSTEIN, B. J.; COREY, M.; LEVISON, H.; DURIE, P.; TSUI, L.-C.; MCINTOSH, I.; KESTON, M.; BROCK, D. J. H.; MACEK, M., JR.; ZEMKOVA, D.; KRASNICANOVA, H.; VAVROVA, V.; MACEK, M., SR.; GOLDBER, N.; SCHWARZ, M. J.; SUPER, M.; WATSON, E. K.; WILLIAMS, C.; BUSH, A.; O'MAHONEY, S. M.; HUMPHRIES, P.; DEARCE, M. A.; REIS, A.; BURGER, J.; STUHRMANN, M.; SCHMIDTKE, J.; WULBRAND, U.; DORK, T.; TUMMLER, B.; CUTTING, G. R. : Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation gly-to-asp at codon 551 and the $\Delta F508$ mutation are clinically indistinguishable from $\Delta F508$ homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. **Am. J. Hum. Genet.**, 51: 245-50, 1992.

HANSSON, G. C. Cystic fibrosis and chloride-secreting diarrhoea. (Letter) **Nature**, 333: 711, 1988.

HODSON, M. E. Thematic Review series: Treatment of cystic fibrosis in the adult. **Respiration**, 67: 95-607, 2000.

HOSLI, P.; VOGT, E. Detection of cystic fibrosis homozygotes with plasma. **Lancet**, I: 543-46, 1979.

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

JORDE, L. B.; CAREY, J. C. C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE R. L. **Genética médica**, 2ªed., Rio de Janeiro, R J, Ed. Guanabara Koogan, 2000.

KAPLAN, E.; SWACHMAN, H.; PERMUTTER, A. D.; RULE, A.; KHAW, K-T.; HOLSCLAN, D. S. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, 279: 56-69, 1968.

KEREM, B.; ROMMENS, J. M.; BUCHANAN, J. A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T. K.; CHAKRAVARTI, A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, 245: 1073-80, 1989.

KEREM, B.; ZIELENSKI, J.; MARKIEWICZ, D.; BOZON, D.; GAZIT, E.; YAHAF, J. et al. Identification of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 8447-51, 1990.

KEREM, E.; KEREM, B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, 22: 387-95, 1996.

KRISTIDIS, P.; BOZON, D.; COREY, M.; MARKIEWICZ, D.; ROMMENS, J.; TSUI, L. C. Genetic determination of pancreatic function in cystic fibrosis. **Am. J. Hum. Genet.**, 50: 1178-84, 1992.

LEWIS, L. G. e COHEN, M. B. A selective advantage for cystic fibrosis carriers. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 21(1): 117-8, 1995.

LIECHTI-GALLATI, S.; NIEDERER, B. U.; SCHNEIDER, V.; MACHLER, M.; ALKAN, M.; MALIK, N. et al. Haplotype analysis for cf-linked dna polymorphisms in switzerland. **Clin. Genet.**, 37: 442-49, 1990.

Living with CF - Sweat test: Cystic Fibrosis Foundation. Disponível em: <http://www.cff.org>. Acesso em 20 de novembro de 2004.

LOIRAT, F.; HAZOUT, S.; LUCOTTE, G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. **Hum. Biol.**, 69: 419-25, 1997.

LUCOTTE, G.; HAZAUT, S.; DE BRAEKELLER, M. Complete map of cystic fibrosis mutation $\Delta F508$ frequencies in western europe and correlation between mutation frequencies and incidence of the disease. **Hum Biol.**, 67: 797-803, 1995.

MACLUSHY, I. & LEVISON, H.- Cystic fibrosis. In: Chernick, V.; Boate, T. E.- Kendig's disorders of the respiratory track in children. Philadelphia. Saunders, 1990. p.692-729.

MAHADEVA, R.; LOMAS, D. A. Secondary genetic factors in cystic fibrosis lung disease. **Thorax**, 55: 446, 2000.

MAROSTICA, P. J.; RASKIN, S.; ABREU-E-SILVA, F. A. Analysis of delta f 508 mutation in brazilian cystic fibrosi population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 529-32, 1998.

MARTINS, C. S.; RIBEIRO, F.; COSTA, F. F. Frequency of the cytic fibrosis $\Delta F508$ mutation in a population from São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 26:1037-40, 1993.

MASSIE, R. J.; PLSSEN, M.; GALZNER, J.; ROBERTSON, C. F.; FRANCIS, I. Newborns screening for cystic fibrosis in Vistoria: 10 years experience (1989- 1998). **Med. J. Aust.**, 172 (12): 584-87, 2000.

MICKLE, J. E.; CUTTING, G. R. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. **Med. Cl. North. Am.**, 84(3): 597-07, 2000.

MORRAL, N.; BERTRANPETIT, J.; ESTIVILL. X.; NUNES, V.; CASALS, T. The origin of the major cystic fibrosis muta ($\Delta F508$) in European populations. **Nat. Genet.**, 7: 169-75, 1994.

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

MULLNS, K.; FALOONA, S.; SCHARF, R.; SAIKI, G.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 51: 263, 1986.

New Alleles And Inherited Diseases. Example: The CFTR Gene and Cystic Fibrosis
Disponível em: <http://www.lehigh.edu/~jas0/G19.html>. Acesso em 20 de janeiro de 2005.

NOVAES, F., ARAÚJO, F. Triagem de mutações do gene CFTR em pacientes com suspeita de fibrose cística do hospital universitário João de Barros Barreto. **Trabalho de Conclusão de Curso – Grau em Medicina – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.**

Objectives and Outline. Disponível em:
http://www.lclark.edu/~bkbaxter/200lecture/o_and_o/mar_23.htm. Acesso em 20 de janeiro de 2005.

OKAY, T. S.; OLIVEIRA, W. P.; RAIZ-JÚNIOR, R.; RODRIGUES, J. C.; NEGRO, G. M. B. DEL. Frequency of the delta f 508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in são paulo: comparision with reported barzilian data. **Clinics.**, 60(2): 131-34, 2005.

OSBORNE, L.; KNIGHT, R. A.; SANTIS, G.; HODSON, M. A mutation in the second nucleotide binding fold of the cystic fibrosis gene. **Am. J. Hum. Genet.**, 48: 608-12, 1991.

PARIZOTTO, E. A.; RIBEIRO, A. F.; COSTA, F. F.; BERTUZZO, C. S.; Molecular characterisation of cystic fibrosis patients in the state of the São Paulo (Brasil). **J. Med. Genet.**, 34 (10): 877, 1997.

PARK, R. W.; GRAND, R. J. Gastrointestinal manifestations of cystic fibrosis: a review. **Gastroenterology**, 81: 1143, 1981.

PEREIRA, L.; RASKIN, S.; FREUND, A. A.; RIBAS, P.D.; CASTRO, R. M.V.; PIGNATTI, P.; CULPI, L. Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183A A→ G in two southern brazilian states. **Genet. and Molec. Biol.**, 22 (3): 291-94, 1999.

PHILLIPSON, G. T. M.; PETRUCCO, O. M.; MATTHEWS, C. D. Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, 15 (2): 431- 35, 2000.

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

RASKIN, S. e FAUEZ, F. R. Aspectos genéticos da fibrose cística. In: Carakushansky G. (Editor), Doenças genéticas em pediatria. Guanabara Koogan, São Paulo, Brasil.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J. A.; KRISHNAMANI, M. R. S. DNA analysis of cystic fibrosis in brazil by direct PCR amplification from guthrie cards. **Am. J. Med. Genet.**, 46: 665-69, 1993.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J. A.; KAPLAN, G.; MCCLURE, M.; VNENCAK-JONES, C.; ROZOV, T.; CARDIERI, J. M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIGLIANI, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.; LUDWIG, N.; PEREIRA, L.; FAUCZ, F.; GABARDO, J.; CULPI, L. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non- $\Delta F508$ mutations in Brazil. *Hum. Biol.*, 71 (1): 111-21, 1999.

REIS, F. J. C.; DAMACENO, N. Fibrose cística. **J. Pediatr.**, 74: S46-94, 1998.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. DE °; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. **J. Pediatr.**, 78 (s2):171-86, 2002.

RIORDAN, J. R. Identification of the cystic fibrosis gene. **Science**, 245: 1066-73, 1989.

ROBINSON, P. Pediatric origins of adult lung disease: Cystic Fibrosis. **Thorax**, 56: 237-41, 2001.

ROMMENS, M. J. Identification of the cystic fibrosis gene II. **Science**, 245: 1059-65, 1989.

ROWNTREE, R. K.; HARRIS, A. The phenotypic consequences of cftr mutation. **Annals of Hum. Genet.** 67: 471-85, 2003.

SALVATORE, F.; SCUDIERO, O.; CASTALDO, G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am. J. of Med. Genet.* 111: 88-95, 2002.

SANTANA, M. A.; MATOS, E.; FONTOURA, M. S.; FRANCO, R.; BARRETO, D.; LEMOS, A. C. M. Prevalence os pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. **The Braz. J. Ofec. Dis.**, 7(1): 69-72, 2003.

SANTIS, G.; OSBORNE, L.; KNIGHT, R.; SMITH, M.; DAVISON, T.; HODSON, M. Genotype-phenotype in cystic fibrosis: results from the study of monozygotic and dizigotic twins with cysric fobrosis. *Pediatr. Pulmonol.*, 8: 239-40, 1992.

STREIT, C.; BULAMARQUE-NETO, A. C.; ABREU E SILVA, F.; GIUGLIANI, R.; PEREIRA, M. L. S. *CFTR* gene: molecular analysis in patients from south brazil. *Mol. Genet. And Met.* 78: 259-64, 2003.

STRINGER, C. B. The emergence of modern human. **Sci. Am.**, 263:96- 104, 1990.

STURGESS, J. M. Morphological characteristics of brochial mucosa in cystic fibrosis. In: QUITON, P. M.; MARTINEZ, J. R.; HOPFER, U. **Fluid and eletrolyte anormalities in exocrine glands in cystic fibrosis.** San Francisco. San Francisco Press, 1982.

THOMPSON, M. W.; McINNES, R. R.; HUNTINGTON, F. W. **Genética Médica**, 6^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TOMASHEFSKI, J. R.; BRUCE, M.; GOLDBERG, H. I. Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis. **Am. Rev. Resp. Dis.**, 133: 535, 1986

TSUI, L. C.; ROMMENS, J.; KEREM, B. S.; ZIELENSKI, J.; CHOU, L.; BOZON, D. Molecular genetics of cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, Supl 5: 58-9, 1990.

TSUI, L. C. The Cystic fibrosis Transmembrane Conductance regulator gene. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, 151: 47-53, 1995.

TSUI, L-C. e DURIE, P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. **Hosp. Pract.**, 32:115-142, 1997.

WELSH, M. J; SMITH, A. E. Molecular mechanisms of cftr chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell**. 73: 1251-54,. 1993.

WOODHEAD, J. L.; FALLON, R.; FIGUERED, H.; LONGDALE, J.; MALCON, A. D. B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Daves, K. E. **Human genetic disease-a practical approach**. Oxford.: IRL Press Limited, 1986, pp51- 64.

ZIELENSKI, J.; TSUI, L-P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. **Anu. Rev. Gen.** 29: 777-807, 1995.

8- ANEXOS

Anexo 1



CEP, 15/03/05
(PARECER PROJETO 297/2003)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

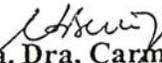
PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES DE FIBROSE CÍSTICA ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO DO RNA MENSAGEIRO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cyntia Arivabeni de Araujo Correia

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o levantamento da frequência das mutações CFTR e relação genótipo/Fenótipo entre os portadores de fibrose cística que realizaram o teste molecular na rotina diagnóstica do laboratório de Genética Molecular/FCM, análise retrospectiva, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2

Escore de Shwachman

A) Nutrição

1. Peso e altura:

- ↑ P 25 (compatível com padrão familiar)
- ↑ P 10 (levemente abaixo do padrão familiar)
- ↑ P 3 (moderadamente abaixo do padrão familiar)
- ↓ P 3 (altura deficiente)
- mal-nutrido e baixo

2. Tônus e massa muscular:

- normais
- bom
- regulares
- pobres
- músculos flácidos, fracos e pequenos

3. Gordura subcutânea:

- normal
- levemente diminuído
- deficiente
- deficiência moderada
- sem gordura subcutânea

4. Maturação sexual:

- normal
- leve retardo
- maturação retardada
- insuficiente

5. Appetite:

- bom
- normal
- regular
- mau
- perda de peso freqüente

6. Fezes:

- normais
- fezes mais freqüentemente e leve alteração
- fezes volumosas, mau cheiro e flutuantes
- fezes pouco formadas, volumosas, mau cheiro e gordurosas
- fezes freqüentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas (prolapso retal freqüente)

B) Atividade Geral

1- Atividade:

- plena
- leve limitação `a atividade intensa
- descansa voluntariamente
- atividade física limitada
- grave limitação da atividade

2- Tolerância aos exercícios:

- normal
- cansa ao final do dia ou após exercício prolongado
- cansa após exercício
- tolerância ao exercício limitada (dispnéico após exercícios)
- inativo ou confinado à cama/cadeira (dispnéia e ortopnéia)

3- Disposição:

- boa
- menos energético, ocasionalmente irritado ou apático
- moderadamente inativo, falta espontaneidade, passivo ou irritável
- agitado, irritado, preguiçoso ou abatido
- apático ou irritável

4- Desenvolvimento motor:

- normal
- limite inferior do desenvolvimento motor normal
- leve retardo motor
- retardo motor moderado
- marcado retardo motor

5- Frequência escolar:

- normal
- boa frequência escolar
- regular frequência escolar
- frequência escolar baixa (professor particular)
- não pode assistir às aulas

C) Exame Físico

1- Tosse:

- sem tosse
- tosse ocasional
- tosse leve e crônica após exercício/choro e ocasionalmente durante o dia (sem tosse noturna)
- tosse crônica, freqüente, repetitiva, produtiva, raramente paroxística

() tosse paroxística grave, produtiva, freqüentemente com vômitos e hemoptise (tosse noturna)

2- FC e FR:

() normais

() normais no repouso

() levemente aumentada

() moderadamente aumentada

() taquipnéia e taquicardia

3- Enfisema:

() sem enfisema

() enfisema leve

() ↑diâmetro antero-posterior e diafragma rebaixado

() enfisema moderado a grave, com deformidade ao RX

() enfisema grave

4- Ausculta Pulmonar:

() pulmões limpos

() MV rude, roncosp e TE prolongado ocasional

() MV rude, crepitantes, roncosp e sibilosp

() crepitantes, roncosp e sibilosp, usualmente presentes e disseminados

() crepitantes, roncosp e sibilosp generalizados

5- Baqueteamento digital:

- sem baqueteamento
- baqueteamento leve
- baqueteamento 1/2
- baqueteamento 2/3
- baqueteamento 3/4

D) Achados Radiológicos:

1- Enfisema:

- sem enfisema
- evidências mínimas
- moderado ↑ diâmetro AP; campos pulmonares + radiolucentes
- enfisema marcado
- alterações extensivas, hiperinsuflação grave

2- Trama bronco-vascular:

- sem aumento
- aumento leve da trama
- trama aumentada
- aumento marcado da trama

3- Infiltrado pulmonar:

- sem infiltrações
- infiltrado ocasional transitório
- focos persistentes de infiltrações
- infiltrados disseminados

4- Atelectasias:

- sem atelectasias
- atelectasias localizadas ou irregulares
- atelectasias segmentares ou lobares ocasionais, cistos localizados
- atelectasias lobares persistentes, formação de broquiectasias, cistos disseminados e abcessos