

LUCIANA CARDOSO BONADIA

CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICOS,
MOLECULARES E FISIOLÓGICOS DE PACIENTES
ADULTOS COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE FIBROSE
CÍSTICA DE UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO BRASIL.

CAMPINAS

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICOS,
MOLECULARES E FISIOLÓGICOS DE PACIENTES
ADULTOS COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE
FIBROSE CÍSTICA DE UM CENTRO DE
REFERÊNCIA NO BRASIL**

Luciana Cardoso Bonadia

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas. Sob orientação da Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B64c Bonadia, Luciana Cardoso, 1977-
Correlação entre aspectos clínicos, moleculares e fisiológicos de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística de um centro de referência no Brasil. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Carmem Sílvia Bertuzzo
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística. 2. Genótipo. 3. Fenótipo. 4. Adulto. I. Bertuzzo, Carmem Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Correlation between clinical, molecular and physiological aspects of adult patients with diagnostic hypothesis of cystic fibrosis in a Brazilian reference Center

Palavras-chave em inglês:

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

Genotype

Phenotype

Adult

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carmem Sílvia Bertuzzo [Orientador]

Marilda de Souza Gonçalves

Fabíola Villac Adde

Fábio Rossi Torres

José Dirceu Ribeiro

Andrea Trevas Maciel Guerra

Data da defesa: 31-08-2011

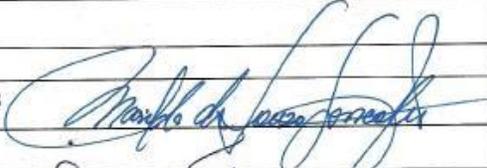
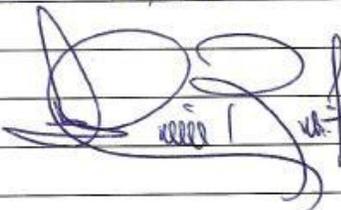
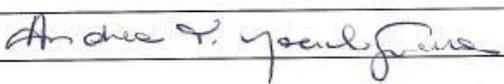
Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Luciana Cardoso Bonadia

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Marilda de Souza Gonçalves	
Professor (a) Doutor (a) Fabíola Villac Adde	Fabíola Adde
Professor (a) Doutor (a) Fábio Rossi Torres	FABIO ROSSI TORRES.
Professor (a) Doutor (a) José Dirceu Ribeiro	
Professor (a) Doutor (a) Andrea Trevas Maciel Guerra	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2011

Ao Roberto Bianchin Barbarini, por
todo amor, incentivo, paciência e
cumplicidade.

Agradecimentos

Uma pesquisa nunca é realizada por uma única pessoa e sim por um conjunto de mãos, cabeças e corações. Gostaria de agradecer, portanto:

à Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela orientação, incentivo, torcida e amizade;

ao grupo de pesquisa em fibrose cística por todo o apoio e todo trabalho em equipe: Dr. Antonio Fernando Ribeiro, Dra. Margarida Amaral, Dra. Maria Ângela Ribeiro, Dra. Adriana Mendes Vinagre, Ms. Fernando Augusto de Lima Marson, Marisa de Sousa, Dra. Anabela Ramalho e Dra. Maria de Fátima Servidoni, somados a muitos outros profissionais que ficam nos bastidores da pesquisa;

aos pacientes com fibrose cística pela participação e disponibilidade;

à todos os funcionários, alunos e docentes do Departamento de Genética Médica pela compreensão, auxílio e amizade. Em especial, à Marilza de Lima Santos e à Maria Madalena Vasconcelos Rosa, por ter “segurado” muita encrência de trabalho com a finalidade de me dar serenidade para continuar o doutorado;

ao Ms. Fernando Augusto de Lima Marson, à Karina da Costa Silveira, à Marcella Bergamini Baptista e à Dra. Adriana Mendes Vinagre cujas contribuições técnicas e científicas foram indispensáveis à conclusão da pesquisa;

à Dra. Maria Angela Gonçalves de Oliveira Ribeiro, fisioterapeuta responsável pelo Laboratório de Fisiologia Pulmonar, cuja ajuda foi indispensável para conclusão desse trabalho e cuja conduta profissional me inspira e me faz perceber o tipo de profissional que quero ser. Aqui aproveito para agradecer os esforços da Josiane Fátima de Souza e da Silvana Dalge Severino para auxiliar nessa pesquisa;

aos pesquisadores Dr. Fábio Rossi Torres, Dr. Fábio Frangiotti Conte, Dra. Fabíola Villac Adde, Dra. Marilda Gonçalves, Dr. José Dirceu Ribeiro, Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra e Dra. Danyella Barbosa Dogini, cujas sugestões a partir da versão preliminar desta tese contribuíram para deixar o trabalho mais completo;

a Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli por toda ajuda durante o doutorado, todas as dicas e torcida;

ao Fernando Augusto de Lima Marson, o Ferzito, que aguentou muito choro, foi companheiro, me incentivou muito, sempre acreditou no meu trabalho e na minha capacidade em pesquisa. Você foi um amigo muito importante nessa jornada;

à Simone Sayuri Tsuneda para quem não tenho nem palavras. A sua amizade foi extremamente importante para eu conseguir superar todas as dificuldades que surgiram nesse período. Mesmo estando longe, você esteve presente me ajudando e me dando serenidade durante o doutorado, principalmente nessa etapa final. Agradeço de coração tudo o que tem feito por mim;

ao Fábio Frangiotti Conte, mais conhecido como Faconte, que também me apoiou muito. Através de nossas conversas eu fui percebendo as minhas características positivas e as minhas deficiências e as suas dicas ajudaram muito mais do que na minha formação acadêmica e profissional: me ajudaram na minha formação como pessoa. Obrigada pela amizade sincera e apoio incondicional;

ao Alexandre Hilário Berenguer de Matos e ao Renato Oliveira dos Santos, meus queridos amigos e auxiliares para assuntos aleatórios. Se não fosse a ajuda de vocês eu certamente não teria tempo para realizar a minha tese;

às minhas amigas queridas, trio parada-dura, Lidiane Camila Rueda, Daniela Tenório Furgeri e Cláudia Estela Gonçalves, pelos momentos de diversão e descontração tão importantes numa etapa tão complexa como o doutorado;

à Cyntia Arrivabeni de Araújo Correia Coutinho e Aline Roberta Bariani Marcelino por toda a amizade, apoio, presença, incentivo, diversão, conversa, descontração. Agradeço por todo apoio técnico e científico nessa pesquisa, toda a participação no ambulatório, as sugestões durante toda essa caminhada. Agradeço também a presença constante na minha vida e todo o carinho que cerca a nossa amizade;

à toda a família do Laboratório de Genética Molecular e de Citogenética Humana que fica nos bastidores de todas as pesquisas realizadas. Nessa caminhada todos torcem pelo sucesso de todos e participam do estabelecimento de um ambiente favorável para a pesquisa. Infelizmente fica difícil citar todo mundo, mas gostaria de deixar aqui um agradecimento para cada um de vocês, os que estão aqui e os que já foram embora, pois cada um teve um pedacinho de contribuição nessa pesquisa;

ao meu pai, Braz Bonadia e à minha mãe, Cinira Cardoso Bonadia, um agradecimento especial por toda a base que me deram, pelos esforços para nos dar estrutura, educação e caráter. Eu não teria chegado até aqui se não fosse por vocês. Agradeço ainda aos meus irmãos Fábio, Graziella e Maurício pelo companheirismo e torcida.

ao meu namorado Roberto Bianchin Barbarini, cujo apoio me fortaleceu nessa etapa da minha vida e cujo amor me tornou completa e estruturada. Você e a Rafaela são a minha família, construída com carinho, amor e respeito. Obrigada por me manter trabalhando, pelo incentivo, apoio e por entender as minhas ausências. Você foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Resumo

A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva letal com alta incidência na região sudeste brasileira. É causada por mutações no gene *CFTR* que codifica uma proteína que se localiza na membrana apical das células epiteliais das vias aeríferas, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, constituindo um canal de cloro. O aumento da viscosidade do muco extracelular é responsável pela maioria das complicações clínicas relacionadas à FC, sendo o acometimento respiratório a principal causa de morbidade e mortalidade. Mais de 1500 mutações foram associadas à FC, divididas em seis classes de acordo com o efeito que causam na produção e atividade da proteína CFTR, sendo a F508del a mais frequente delas. Com o aumento do diagnóstico precoce e melhora da abordagem terapêutica, cada vez mais pacientes chegam à idade adulta. A atenção ao paciente deve acompanhar a mudança demográfica tendo em vista as necessidades específicas da idade sejam clínicas, psicológicas ou sociais.

O objetivo desse projeto foi caracterizar uma amostra de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC e correlacionar os aspectos clínicos, moleculares e fisiológicos. A caracterização clínica foi realizada por pesquisa de dados clínicos no arquivo médico dos pacientes; a molecular foi realizada por métodos de genotipagem como DHPLC, sequenciamento do DNA e MLPA e a fisiológica foi realizada por medidas de corrente intestinal por micro-câmara de Ussing.

Foi observado que pacientes sem atividade da CFTR tendem a ser diagnosticados mais cedo. Houve associação entre as classes de mutação de *CFTR* e a atividade do canal e uma relação entre a gravidade da mutação/inatividade de CFTR e a idade ao diagnóstico, função pulmonar e gravidade avaliada por Escore de Shwachman. Houve associação entre a colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa* e a obstrução pulmonar avaliada por dados de espirometria.

As principais contribuições desse estudo foram: implementação de um método pioneiro no Brasil que além de servir como ferramenta diagnóstica tem sido muito utilizado na pesquisa de novos fármacos para tratamento mutação-dirigidos; caracterização clínica, molecular e fisiológica dos adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística, um grupo de pacientes cada vez mais frequente no atendimento médico dessa doença.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a lethal autosomal recessive disease with high incidence in Southeast Brazil. It is caused by mutations in the *CFTR* gene, which encodes a protein that is located in the apical membrane of epithelial cells of airway tract, pancreas, salivary and sweat glands, intestine and reproductive system, forming a chloride channel. The increasing of the viscosity of extracellular mucus is responsible for most clinical complications related to CF, with pulmonary impairment as a major cause of morbidity and mortality. More than 1500 mutations have been associated with CF, divided in six different classes according to the effect on CFTR protein production and activity, F508del being the most common type. With the increase of early diagnosis and improved therapeutic approach, more and more patients reach adulthood. The patient care should follow the demographic shift regarding the specific needs of the age are clinical, psychological or social.

The aim of this study was to characterize a sample of adult CF patients with diagnosis of CF and to correlate the clinical, molecular and physiological features. Clinical characterization was obtained from archived medical records. Molecular characterization was performed by genotyping methods such as DHPLC, MLPA and sequencing and physiological characterization was performed by intestinal current measurements by micro-Ussing chamber.

It was observed that patients in whom the CFTR channel does not show any residual activity tend to be diagnosed earlier. There was an association between the classes of CFTR mutation and the activity of the channel and a relationship of mutation severity/inactivity of CFTR with the age at diagnosis, lung function and severity score assessed by Shwachman-Kulczycki. There was an association between chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and pulmonary obstruction.

The main contributions of this study were: implementation of a method pioneered in Brazil that serves as a diagnostic tool and has been used in researching new drugs for treatment of specific mutation and clinical, physiological and molecular characterization of adults with cystic fibrosis, a growing group in medical care.

Lista de Figuras

Figura 1. Histórico relevante sobre o diagnóstico, descrição clínica e tratamento da FC.	4
Figura 2. Esquema do gene <i>CFTR</i>	8
Figura 3. As seis classes de mutações que causam FC, suas consequências e exemplos	9
Figura 4. Representação esquemática da proteína CFTR.	12
Figura 5. Modelo de transporte através do canal CFTR.	14
Figura 6. Idade aproximada de surgimento das manifestações clínicas da FC.	16
Figura 7. Causas e consequências das manifestações pulmonares presentes na FC.	18
Figura 8. Valores de concentração de cloreto no suor para diagnóstico de FC e as possíveis causas de resultados falsos	21
Figura 9. Relação entre a expressão de CFTR funcional e os fenótipos prováveis	22
Figura 10. Idade média de sobrevivência de pacientes com FC ao longo dos anos desde a descrição da FC. .	22
Figura 11. Prevalência de pacientes com FC, pediátricos e adultos, entre 1986 e 2009.	24
Figura 12. Fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.	33
Figura 13. Fragmento amplificado para análise da mutação F508del. Sublinhado, a região de anelamento dos iniciadores. Em destaque, as bases deletadas características dessa alteração molecular.	41
Figura 14. Padrões esperados na análise da mutação F508del.	42
Figura 15. Métodos utilizados nas diferentes reações de amplificação realizadas para a análise do gene <i>CFTR</i>	43
Figura 16. Padrão de fusão (<i>melting</i>) do exon 2.	49
Figura 17. Condições das reações de sequenciamento de DNA para a investigação de mutações no gene <i>CFTR</i>	51
Figura 18. Padrão de eletroforese em capilar de uma amostra de aproximadamente 50ng de DNA humano controle analisado com o kit SALSA® MLPA® P091-C1 CFTR.	52
Figura 19. Localização das sondas e tamanhos dos fragmentos gerados após a amplificação do sinal pelo kit SALSA® MLPA® P091-C1 CFTR.	53
Figura 20. Exemplo de resultados de MLPA.	55
Figura 21. Detalhamento da análise da mutação 1584-18672pb A>G.	56
Figura 22. Detalhamento da análise da mutação 3849 + 10Kb C>T.	57
Figura 23. Detalhamento da micro-câmara de Ussing. A.	59
Figura 24. Modelo celular de absorção de sódio e cloro em cólon de mamíferos.	60
Figura 25. Circuito elétrico na micro-câmara de Ussing em condições de circuito-aberto.	62
Figura 26. Análise da biópsia retal em micro-câmara de Ussing.	64
Figura 27. Relação entre insuficiência pancreática e idade ao diagnóstico.	77
Figura 28. Relação entre a colonização crônica por <i>P. aeruginosa</i> (<i>Pa</i>) e a função pulmonar.	78
Figura 29. Gel não desnaturante de poliacrilamida a 12% demonstrando os resultados obtidos na análise de F508del.	79
Figura 30. Gel de agarose a 1% ilustrando o resultado da amplificação dos fragmentos que contém todos os exons e junção exon/intron do gene <i>CFTR</i>	80
Figura 31. Resultados de pacientes que apresentaram padrão de retenção alterado.	82
Figura 32. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 11 da paciente 411/01 (P.D.R.)	84
Figura 33. Sequenciamento do fragmento que contém os exons 6b, 11 e 13 do paciente 535/01 (V.A.M.) ...	85
Figura 34. Sequenciamento do fragmento que contém do exon 1 da paciente 790/05 (A.A.P.)	86
Figura 35. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 20 da paciente 456/07 (K.K.S.B.M.)	87
Figura 36. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 6b da paciente 501/05 (J.V.R.A.)	88
Figura 46. Relação entre as classes de mutação e os marcadores de gravidade: idade do paciente ao diagnóstico, Índice de Tiffeneau e FEF _{25-75%}	103
Figura 47. Resposta quantitativa de I _{sc} após estímulo por AMPc e Ca ⁺² agrupados pela atividade de CFTR (A) e pela classe de mutações de <i>CFTR</i> (B).	106
Figura 48. Concentração de cloreto no suor.	106
Figura 49. Resposta quantitativa de I _{sc} após estímulo por AMPc ou por Ca ⁺² e relação com marcadores de gravidade clínica.	108
Figura 50. Relação entre idade ao diagnóstico e secreção de cloreto após estímulo por Ca ⁺² e entre o escore de Bhalla e a secreção de cloreto após estímulo por AMPc.	110

Lista de Quadros

Quadro 1. Aspectos clínicos dos pacientes com hipótese diagnóstica de FC.	34
Quadro 2. Caracterização do grupo de referência.....	37
Quadro 3. Especificações das condições para amplificação dos fragmentos para a caracterização molecular.	43
Quadro 4. Pacientes submetidos à análise por DHPLC.	46
Quadro 5. Temperaturas de análise em DHPLC e fator de correção (<i>Time Shift</i>) para cada fragmento amplificado.....	47
Quadro 6. Acervo de mutações no gene <i>CFTR</i> para teste da sensibilidade do DHPLC.....	49
Quadro 7. Idade ao diagnóstico e resultados de teste de sódio e cloro no suor dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.....	69
Quadro 8. Características clínicas gerais dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.....	71
Quadro 9. Avaliação das manifestações pulmonares dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.....	73
Quadro 10. Escores de gravidade dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.....	75
Quadro 11. Características clínicas adicionais dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC, como resultado do CT de tórax.	76
Quadro 12. Resultados dos padrões de retenção obtidos pela técnica de DHPLC..	81
Quadro 13. Resultados de sequenciamento dos pacientes participantes da pesquisa.	89
Quadro 14. Variações moleculares encontradas no gene <i>CFTR</i> e não associadas à FC.....	92
Quadro 15. Caracterização molecular dos pacientes participantes da pesquisa.....	96
Quadro 16. Resultados qualitativos e quantitativos relativos à caracterização fisiológica dos pacientes participantes da pesquisa.	97
Quadro 17. Resultados qualitativos e quantitativos relativos à caracterização fisiológica dos controles.	99
Quadro 18. Grupo dos pacientes que tiveram os alelos de <i>CFTR</i> genotipados e valores indicadores de gravidade.	102
Quadro 19. Agrupamento dos pacientes com relação a função de <i>CFTR</i> , genótipos associados e a classe da mutação de menor efeito.	104

Lista de Tabelas

Tabela 1. Incidência mundial da FC	6
Tabela 2. Incidência da FC em diferentes grupos étnicos.	6
Tabela 3. Relação entre o acometimento pancreático e marcadores de gravidade.	77
Tabela 4. Relação entre função pulmonar e colonização por <i>P. aeruginosa</i>	78
Tabela 5. Relação entre a atividade de CFTR e marcadores de gravidade.	107
Tabela 6. Distribuição dos pacientes em faixas de gravidade da função pulmonar e relação com a atividade da CFTR.	109
Tabela 7. Apresentações clínicas relacionadas à FC.	111

Lista de Abreviaturas e siglas

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
ATP	Adenosina trifosfato
CaCC	Canal de cloro dependente de cálcio
CBAVD	Agenesia bilateral do vaso deferente
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CIPED	Centro de investigação em pediatria
CT	Tomografia computadorizada
CVF	Capacidade vital forçada
DHPLC	<i>Denaturing high performance liquid chromatography</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENaC	<i>Epithelial Na⁺ channel</i>
FC	Fibrose cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FEF _{25%-75%}	Fluxo expiratório forçado entre 25 e 75%
HC	Hospital das clínicas
ICM	<i>Intestinal current measurement</i>
IMC	Índice de massa corporal
IP	Insuficiência pancreática
Isc	<i>Inverse response of short current</i>
LAFIP	Laboratório de fisiologia pulmonar
MLPA	<i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i>
MP	Membrana plasmática
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NGRL	<i>National Genetics Reference Laboratory</i>
NPD	<i>Nasal potential difference</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORCC	<i>Outwardly rectifying chloride channel</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pi	Fósforo inorgânico
PKA	<i>Phosphokinase A</i>
RD	<i>Regulatore domain</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Rte	Resistência transepitelial
SAME	Serviço de arquivo médico
SP	Suficiência pancreática
SpO ₂	Saturação transcutânea de oxigênio
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMD	<i>Transmembranic domain</i>
VEF ₁	Volume expiratório forçado no 1 segundo
Vte	Voltagem transepitelial

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XIX
LISTA DE FIGURAS.....	XXIII
LISTA DE QUADROS.....	XXV
LISTA DE TABELAS.....	XXVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XXIX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1. HISTÓRICO DA FIBROSE CÍSTICA.....	3
2. EPIDEMIOLOGIA.....	5
3. BIOLOGIA MOLECULAR DA FC.....	7
A) <i>Gene CFTR e mutações</i>	7
B) <i>Proteína CFTR: produção, transporte e funcionamento</i>	11
4. FISIOPATOLOGIA.....	15
5. APRESENTAÇÃO CLÍNICA E TRATAMENTO.....	16
A) <i>Manifestações gastrointestinais</i>	17
B) <i>Manifestações pulmonares</i>	17
C) <i>Outras manifestações clínicas</i>	20
6. FC: A MUDANÇA NO PANORAMA DEMOGRÁFICO.....	22
A) <i>Importância da atenção à transição da pediatria ao atendimento ao adulto</i>	22
B) <i>Adultos com FC</i>	24
7. JUSTIFICATIVA.....	25
2. OBJETIVO.....	27
3. SUJEITOS E MÉTODOS.....	31
1. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES:.....	33
A) <i>Seleção de pacientes</i>	33
B) <i>Caracterização clínica</i>	37
2. MATERIAL BIOLÓGICO:.....	39
3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR:.....	40
A) <i>Pesquisa direta da mutação F508del</i>	40
B) <i>Amplificação dos fragmentos contendo as regiões codificantes do gene CFTR e as junções intron/exon</i>	42
C) <i>Cromatografia líquida desnaturante de alta resolução – DHPLC (do inglês, Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)</i>	45
D) <i>Sequenciamento automático de DNA</i>	50
E) <i>MLPA (do inglês, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)</i>	51
F) <i>Outras alterações</i>	55
4. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA.....	57
5. ANÁLISE DOS DADOS.....	64

4. RESULTADOS	67
1. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA	69
2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	78
A) <i>Pesquisa direta da mutação F508del</i>	78
B) <i>Amplificação dos fragmentos contendo as regiões codificantes do gene CFTR e as junções intron/exon</i>	79
C) <i>Cromatografia líquida desnaturante de alta resolução – DHPLC</i>	80
D) <i>Sequenciamento automático de DNA</i>	83
1. Amostras com padrão de retenção alterado no DHPLC	83
2. Diretamente das reações de amplificação	88
E) <i>MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)</i>	93
F) <i>Outras alterações</i>	95
3. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	97
4. CORRELAÇÃO ENTRE OS ASPECTOS CLÍNICOS, GENÉTICOS E FISIOLÓGICOS	102
5. DISCUSSÃO	113
1. ASPECTOS CLÍNICOS	115
2. ASPECTOS MOLECULARES	119
3. ASPECTOS FISIOLÓGICOS	124
4. CORRELAÇÕES ENTRE A CLÍNICA, A GENÉTICA E A FISIOLOGIA DE PACIENTES COM FC	126
A) <i>Relação entre tipos de mutação e gravidade da doença</i>	126
B) <i>Relação entre a atividade de CFTR e os genótipos dos pacientes</i>	127
C) <i>Relação entre a atividade de CFTR e a clínica dos pacientes</i>	132
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
6. CONCLUSÃO	137
ANEXO 1	149
ANEXO 2	151

1. Introdução

1. Histórico da fibrose cística

“Pobre niño aquél al que, al besar su frente, sabe a sal. Un embrujo a caído sobre él y no tardará en morir”^a. Essa frase do século XVI conhecida pelo meio popular de algumas regiões do centro e norte da Europa refere-se a uma característica clínica marcante da fibrose cística (FC).

A FC foi reconhecida como uma doença distinta em 1938 quando estudos de autópsia de crianças desnutridas identificaram uma doença de obstrução dos ductos glandulares por muco, chamada fibrose cística do pâncreas, distinta à síndrome celíaca (1). Essa doença foi caracterizada pela deficiência na absorção de gordura e proteína, esteatorréia, retardo no desenvolvimento pondero-estatural e infecção pulmonar (2). O muco espesso e pegajoso que leva ao entupimento dos ductos das glândulas mucosas de todo o corpo deu origem a denominação alternativa mucoviscidose (3). Em 1946 a FC começou a ser reconhecida como uma doença genética com padrão de herança autossômico recessivo (4). Em meados de 1948 o pediatra Paul di Sant’Agnese fez uma descoberta crítica: muitas crianças com FC apresentavam prostração sob calor e seu suor era anormal, com a concentração de sódio e cloreto cinco vezes maior (5). A elevada concentração de cloreto no suor possibilitou um teste diagnóstico conveniente. A técnica de iontoforese por pilocarpina descrita por Gibson e Cooke em 1959 (6) trouxe praticidade a esse tipo de teste e ainda hoje poucos testes têm esse poder discriminatório para a FC. A descoberta dessa anormalidade trouxe evidências de

^a Pobre criança aquela que, ao ser beijada na testa, apresenta um gosto salgado. Um feitiço caiu sobre ela e não tardará a morrer.

que o defeito básico poderia não ser a produção de muco, sua modificação ou a secreção de macromoléculas (2). Em 1983, Paul Quinton utilizou os ductos de suor para explicar a falha do transporte de cloreto como o defeito básico da FC (7). Knowles e colaboradores e Boucher e colaboradores identificaram na mesma época o aumento na reabsorção de sódio como uma característica regular da FC nas vias aeríferas (8, 9). O gene associado à FC, chamado *CFTR* (do inglês, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) foi clonado em 1989 (10, 11, 12). A figura 1 ilustra o histórico da FC desde as primeiras descobertas até meados de 2008 (2).

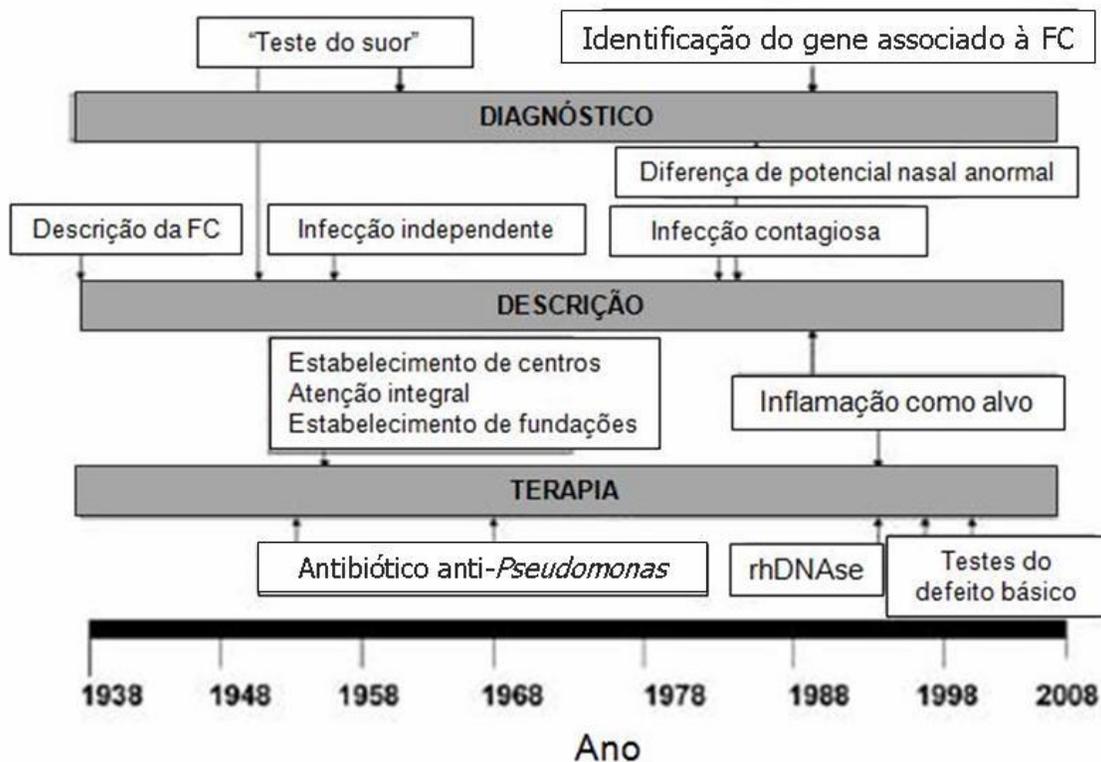


Figura 1. Histórico relevante sobre o diagnóstico, descrição clínica e tratamento da FC. Adaptado de Davis, 2006 (2).

2. Epidemiologia

A Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é uma doença autossômica recessiva letal que acomete aproximadamente 70.000 indivíduos no mundo (13), apesar de sua incidência variar conforme o grupo étnico em que está presente, ou ainda, dentro de um mesmo grupo étnico (14, 15, 16).

Estimar a incidência da FC é muito complicado por várias razões, incluindo a heterogeneidade da apresentação clínica que leva a diagnósticos tardios ou mesmo perda do diagnóstico por morte precoce, diferenças na habilidade de identificar a doença por limitações de teste diagnóstico, triagem neonatal em apenas parte da população e casos não comunicados ou mal classificados (17). As principais análises relacionadas à estimativa da incidência da FC consideram os registros canadenses (18, 19), equatorianos (20), franceses (21, 22), irlandeses (23), italianos (24, 25), suecos (26), ingleses (27) e americanos (28, 29) e estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Incidência mundial da FC, adaptado de Salvatore et al., 2011 (17).

Ano	País	Nº de pacientes	Período	Incidência	Ref.
2007	Equador	62	Não consta	1:11.252	20
2007	França	4104	1994-2003	1:4.600	21
2007	Irlanda	649	2001-2003	1:1.353	23
2005	Canadá	Não consta	1971-2000	1:2.714 (1971-87) 1:3.608 (1988-2000)	19
2004	Itália	1742	1988-2001	1:4.238	25
2002	França	543	1960-1999	1:1.787 a 1:3.482	22
1999	Itália	3617	1988-1997	1:4.700 e 1:3.000 (em Veneto) 1:3.200	24
1998	EUA -CFF	17755 (caucasianos) 601 (afroamericanos)	1994	(caucasianos) e 1:15.000 (não caucasianos)	29
1997	Inglaterra	6657	1968-1995	1:2.415	27
1996	Canadá	3795	1970-1989	1:2.500 e 1:891 (em Quebec) 1:2.906	18
1996	EUA-CFF	19781	1989-1991	(caucasianos) e 1:12.163 (não caucasianos)	28
1982	Suécia	116	1968-1977	1:2.200 a 1:4.500	26

Trata-se de uma doença rara nos países africanos e asiáticos (14) (Tabela 2), com uma incidência estimada de 1/350.000 no Japão (30).

Tabela 2. Incidência da FC em diferentes grupos étnicos, adaptado de Fitzsimmons, 1993 (14).

População	Incidência
Europeus	1:2.500
Povos Hispânicos	1:9.500
Índio norte-americano	1:10.000
Negros americanos	1:15.000
Africanos	1:40.000
Asiáticos	1:50.000
Aborígenes do Hawaií	1:90.000

No Brasil, a incidência na região sul assemelha-se à da população caucasiana centro-européia que é de um em cada 2.500 nascimentos (31).

Portanto, a incidência de portadores de mutações no gene associado à FC nessa região é de aproximadamente um em cada 25 a 26 pessoas. Em outras regiões, a incidência da doença pode diminuir até quatro vezes (31). Porém, os dados sobre incidência da FC no Brasil são controversos. Uma revisão de estudos de triagem neonatal realizados no Brasil feita por Rodrigues e colaboradores (2008) (32) mostrou que a incidência da FC nos estados de Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais e São Paulo é de 1:9.520, 1:8.779, 1:9.115 e 1:8.403, respectivamente (33, 34, 35, 36).

3. Biologia molecular da FC

A) Gene *CFTR* e mutações

A FC é uma doença genética com padrão de herança autossômico recessivo, o que significa que, para desenvolver FC, uma pessoa deve possuir os dois alelos alterados. É causada por mutações em um único gene localizado no braço longo do cromossomo 7, região 7q3.1, constituído por 27 exons (Figura 2). Esse gene codifica uma proteína transmembrânica reguladora da condutância iônica (CFTR) que age como canal de cloreto (11).

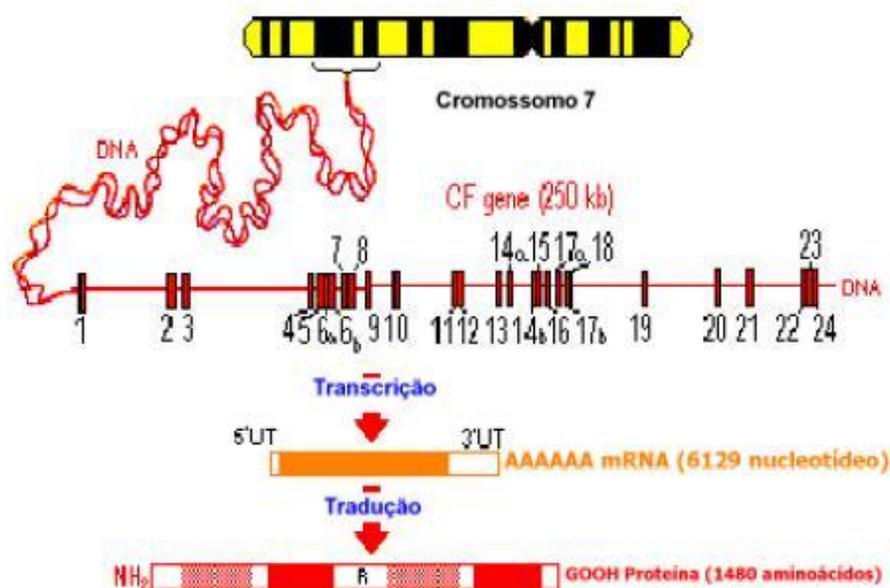


Figura 2. Esquema do gene *CFTR*, retirado de Correia, 2005 (37).

A mutação mais frequente responsável pela FC é a deleção de uma fenilalanina no resíduo 508 da proteína (F508del), que leva a deficiência no dobramento da CFTR e, posteriormente, sua degradação no retículo endoplasmático rugoso (38). Tal alteração está presente em 70 a 95% dos alelos responsáveis pela FC em países do leste europeu. No Brasil essa alteração contribui com cerca de 50% dos alelos responsáveis pela doença nas regiões sul e sudeste (31, 37). A porcentagem baixa quando comparada aos países europeus que colonizaram o Brasil e que contribuíram de forma importante na composição genética dessas regiões brasileiras, reflete o alto índice de miscigenação racial característico de nosso país (39). Além da F508del, mais de 1800 alterações moleculares já foram descritas no gene *CFTR*, mais de 1500 associadas ao fenótipo (40).

As mutações da FC foram divididas em seis diferentes classes (Figura 3) de acordo com o efeito que causam no processo de formação da proteína CFTR madura. As classes I a III apresentam fenótipo mais grave, já que englobam mutações que levam à não produção da proteína CFTR ou à produção de proteína inativa (41, 42).

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

Figura 3. As seis classes de mutações que causam FC, suas consequências e exemplos, onde MP=membrana plasmática. Adaptado de Zielenski e Tsui, 1995 (41) e Haardt et al., 1999 (42).

As mutações de classe I resultam na ausência de produção da CFTR, causada pelas mutações que alteram sinais de encadeamento (*splicing*), mudanças de fase de leitura ou sem sentido, que geram proteínas truncadas que são degradadas (41). As relacionadas à formação de códon de parada prematuro levam ainda a degradação do RNA mensageiro através do mecanismo de decaimento de RNA mediado pela falta de sentido (38). As mutações de classe II

alteram os eventos de processamento e maturação da proteína, com consequente retenção no retículo endoplasmático rugoso e degradação. A mutação mais frequente, a F508del, pertence a essa classe (43). As mutações da classe III afetam o domínio regulatório do canal, incapacitando o processo de abertura (44).

As mutações agrupadas nas três últimas classes (IV, V e VI) estão associadas com alguma secreção de cloreto, embora em geral esta não chegue a atingir 10% do normal. Um estudo mostrou que níveis de expressão de pelo menos 5% do RNA mensageiro normal estão ligados ao prognóstico melhor da doença (45).

As mutações de classe IV produzem uma proteína que chega corretamente na membrana e responde à estimulação por ATP, porém com redução da condutância de íons cloreto (38). As mutações de classe V produzem quantidade diminuída da proteína normal de forma a reduzir os níveis de atividade de CFTR (46). Mutações de erro de encadeamento que produzem pequena porcentagem de RNAm normais estão dentro dessa categoria. As mutações de classe VI são aquelas que levam a produção de proteínas que possuem tempo de permanência reduzido na membrana apical das células (42).

O conhecimento da genética da FC possibilitou o desenvolvimento de pesquisas que visam a identificação de substâncias que atuam corrigindo o efeito que determinadas mutações causam na produção e atividade da CFTR. Em mutações de classe I, antibióticos aminoglicosilados como a gentamicina têm sido descritos como supressores do códon de parada prematuro levando a incorporação

de um aminoácido, permitindo que a tradução prossiga até o final do transcrito (47). Nas mutações de classe II, chaperonas estabilizam a estrutura protéica e promovem o dobramento adequado possibilitando o transporte à superfície celular da proteína resultante (48). Em mutações de classe III, a regulação do canal é beneficiada por potenciadores da CFTR como as alquilxantinas e o flavonóide genisteína (49). Em mutações de classe IV, a compensação pela redução de condutância pode ser alcançada pelo aumento de CFTR na superfície celular através de melhora no transporte ou ainda pelo aumento no estímulo dos canais existentes com o uso de potenciadores (38). Em mutações de classe V, os potenciadores também podem ser utilizados, uma vez que a produção baixa de CFTR, consequente do tipo de mutação, pode ser compensada pelo aumento da atividade das proteínas normais que já estão na superfície celular (38).

Apesar de existir a relação entre gravidade clínica e classe de mutação de *CFTR*, a FC apresenta expressividade variável, ou seja, mesmo apresentando a mesma mutação, o fenótipo ou a gravidade pode variar. Mekus e colaboradores (2000) (50), em seus estudos com gêmeos, sugeriram outro componente genético, que somado às mutações do gene *CFTR* e ao ambiente, atua na modulação da gravidade clínica da FC. De fato, cada vez mais genes moduladores da gravidade clínica estão sendo descritos (51).

B) Proteína CFTR: produção, transporte e funcionamento

A proteína CFTR constitui um canal de cloreto que é ancorado na membrana

apical das células epiteliais das vias aeríferas, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor (52). Essa proteína é membro da superfamília dos transportadores ABC (do inglês, *ATP binding cassette*) e consiste em 1480 aminoácidos arranjados em dois domínios transmembrânicos, TMD-1 e TMD-2 (do inglês, *transmembranic domains*), dois domínios de ligação ao ATP, NBD-1 e NBD-2 (do inglês, *nucleotide binding domain*) e um único domínio regulatório RD (do inglês, *regulator domain*), com muitos sítios possíveis de fosforilação, que auxiliam na regulação da atividade do canal (53) (Figura 4). Além de exercer a função como canal de cloreto dependente de AMP cíclico e/ou de proteína quinase A (PKA), atua na regulação de outros canais iônicos, como o ENaC (do inglês, *epithelial Na⁺ channel*).

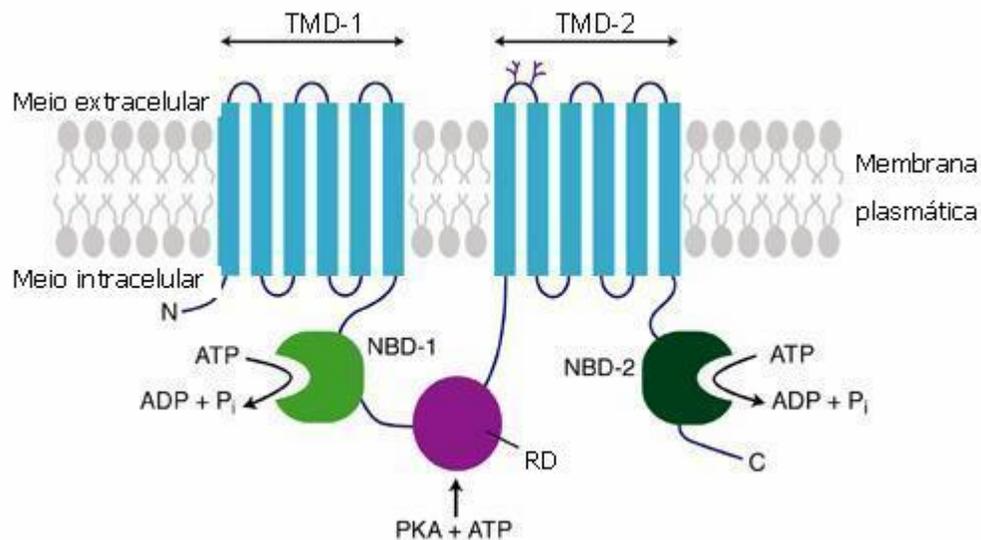


Figura 4. Representação esquemática da proteína CFTR, adaptado de Riordan, 2005 (53).

A tradução do RNAm acontece no retículo endoplasmático rugoso (RER) e durante esse processo o polipeptídeo CFTR é integrado em sua membrana e é N-

glicosilado pela adição de dois grupos de glicosilação em sua alça extracelular. Nesse ponto, o peso molecular da proteína CFTR aumenta de 130 para 150KDa (54). Com a adição de chaperonas moleculares, tais como a calnexina e Hsp 70, a CFTR é dobrada corretamente, fica resistente a proteases e é transportada para o complexo de Golgi, onde os grupos glicosilados são posteriormente modificados para formar a proteína madura de 170KDa. Essa última forma é então transportada para a membrana plasmática de células que expressam a proteína CFTR, onde funciona como um canal de cloreto (55). Uma vez presente na membrana celular, a CFTR submete-se a ciclos de endocitose e reciclagem de volta a membrana (56). A extremidade C-terminal da CFTR contém um sinal de internalização (nas proximidades da tirosina na posição 1424). A troca do resíduo de tirosina por alanina leva a redução de 40% no processo de endocitose (57) e previne a ligação do complexo adaptador AP-2 (58). Esse processo de reciclagem é regulado por AMPc e um aumento de AMPc resulta em um aumento considerável de CFTR presente na membrana celular (59). A proteína madura tem meia-vida de 16 horas e é degradada por lisossomos (55).

A proteína CFTR funciona como um canal de cloreto e sua regulação é muito complexa. Múltiplas quinases podem ativar o canal de cloreto CFTR, porém apenas a ativação dependente de PKA é descrita em detalhes. Um modelo simplificado está ilustrado na figura 5 (54).

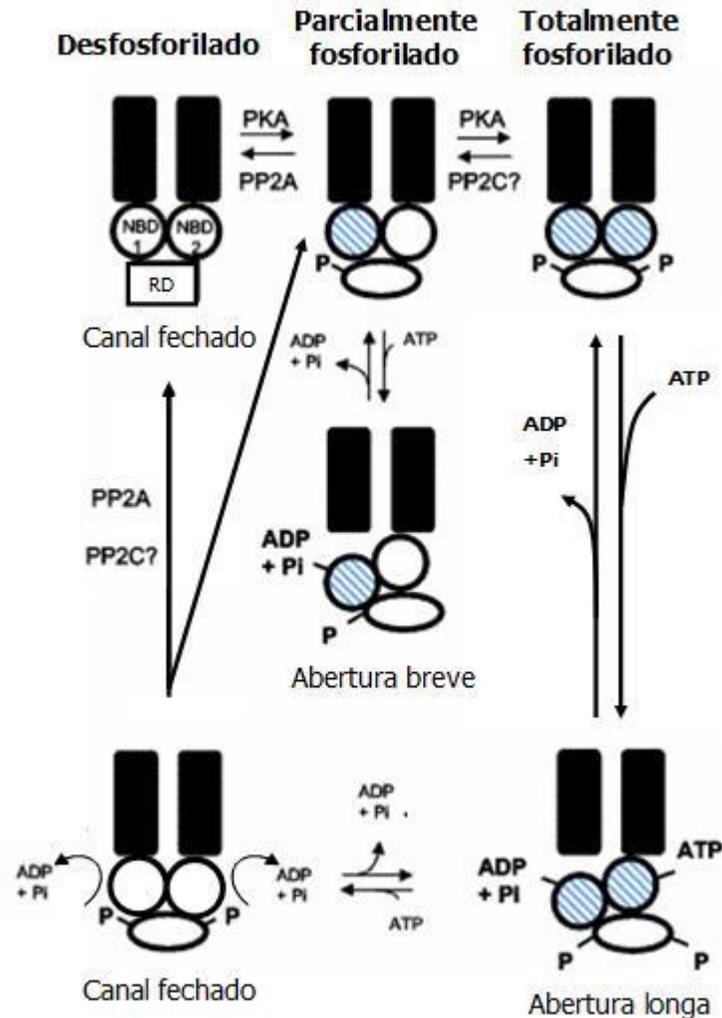


Figura 5. Modelo de transporte através do canal CFTR, onde azul evidencia a ligação a nucleotídeos, PKA=fosfoquinase A, PP=fosfatase alcalina, ATP= adenosina trifosfato, ADP=adenosina difosfato, Pi= fósforo inorgânico, P= fosforilado, NBD=domínio de ligação a nucleotídeo e RD=domínio regulatório. Adaptado de Vankeerberghen, 2002 (54).

Primeiramente, o RD é fosforilado por PKA dependente de AMPc. Isso permite a ligação de um ATP ao NBD1. Quando o ATP é hidrolizado pelo NBD1, o canal abre e ânions podem fluir de acordo com o gradiente eletroquímico através do poro formado pelo domínio transmembrânico. Quando o RD está totalmente fosforilado, o NBD2 pode se ligar ao ATP. Esse evento estabiliza a abertura do canal de cloreto e resulta em aberturas mais longas. Quando, num passo seguinte,

o ATP é hidrolizado no NBD2 e ADP e Pi são liberados de ambos NBDs, o canal se fecha novamente (60). Enquanto o RD está fosforilado, os ciclos de ligação e hidrólise do ATP em ambos os NBDs podem continuar e, como consequência, há abertura e fechamento do canal. Entretanto, quando o RD é desfosforilado por fosfatases, por exemplo a PP2A e a PP2C (61, 62), os NBDs não são capazes de se ligar ao ATP e o canal vai ficar no estado fechado até o RD ser refosforilado pela PKA.

4. Fisiopatologia

A CFTR é mais do que um canal de cloreto. Ela atua inibindo o ENaC, ativa canais de cloreto que não o CFTR (ORCC- do inglês, *outwardly rectifying chloride channel*), ativa canais de ATP a ela associados, sensibiliza canais de potássio a determinados compostos, inibe canais aniônicos regulados por volume e correntes de cloreto ativadas por cálcio endógeno e alteram a composição iônica de compartimentos intracelulares como complexo de Golgi e lisossomos (processo esse importante na glicosilação), além de regular o transporte intracelular de vesículas (54).

A fisiopatologia da fibrose cística pode ser entendida, de uma maneira simplificada, da seguinte forma: como a CFTR age como canal que além de transportar ânions de cloreto inibe a absorção de cátions de sódio pelo ENaC, a falta ou o mau funcionamento da CFTR na membrana apical de células onde deveria ser expressa, faz com que os ânions cloreto permaneçam contidos dentro

da célula e a absorção de sódio seja exacerbada, aumentando a pressão osmótica intracelular, o transporte de água para o interior da célula e, como consequência, levando ao aumento da viscosidade do muco extracelular. É esse muco viscoso, que deu origem ao outro nome da doença (mucoviscidose), que é responsável pela maioria das complicações clínicas relacionadas à FC.

5. Apresentação clínica e tratamento

Os sintomas relacionados à FC aparecem ao longo da vida com grande sobreposição e variabilidade, de paciente para paciente, tanto dos sintomas como da idade em que eles acontecem. A figura 6 mostra a idade aproximada do surgimento de algumas das maiores complicações clínicas da doença (63).

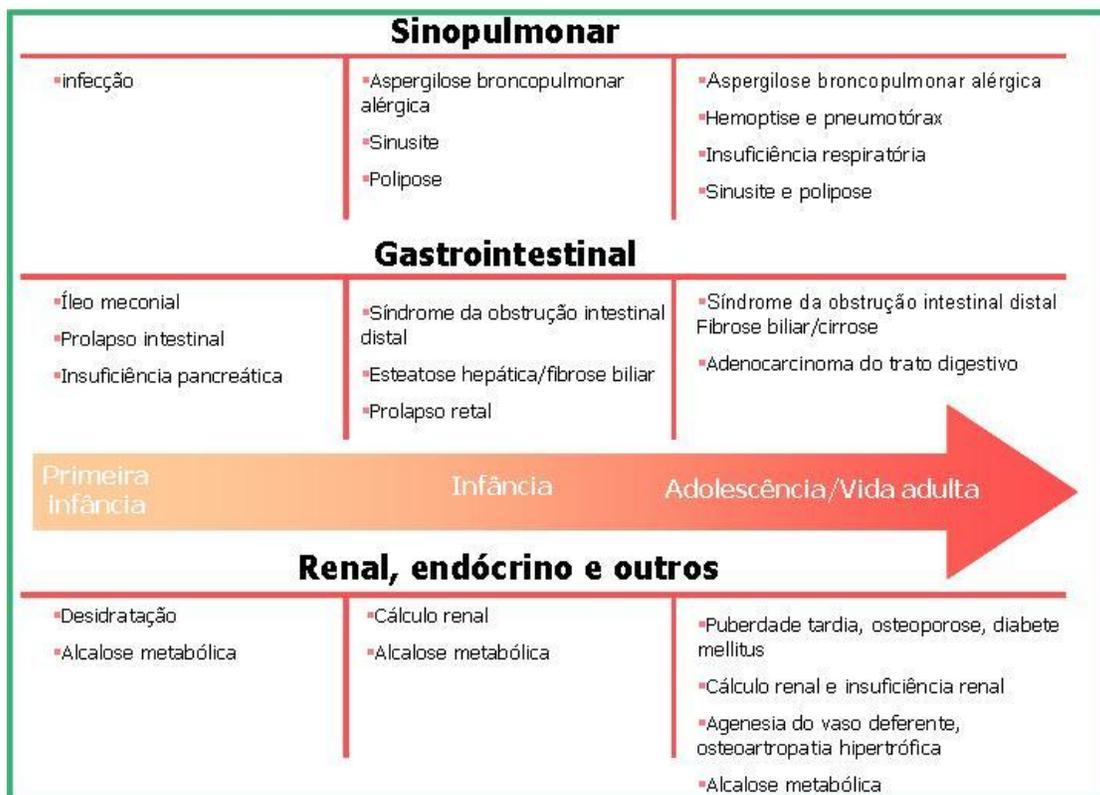


Figura 6. Idade aproximada de surgimento das manifestações clínicas da FC, adaptado de O'Sullivan e Freedman, 2009 (63).

A) Manifestações gastrointestinais

Cerca de 15% dos bebês com FC nascem com íleo meconial, uma condição obstrutiva secundária à presença do muco espesso no intestino. De 85 a 90% dos nascidos com FC desenvolvem insuficiência pancreática (IP), por causa da obstrução dos canalículos pancreáticos por tampões de muco espesso. Isso impede a liberação das enzimas para o duodeno e as consequências da IP são esteatorréia, deficiência de vitaminas lipossolúveis e desnutrição com baixo ganho pondero-estatural. Os pacientes que não desenvolvem a IP tem melhor prognóstico, pois conseguem manter melhor estado nutricional (64). As secreções intestinais espessas, a má absorção e a baixa motilidade do intestino podem levar a obstrução intestinal distal em pacientes mais velhos. A baixa absorção de vitaminas lipossolúveis pode levar a acrodermatite, anemia, neuropatia, cegueira noturna, osteoporose, entre outras. Os pacientes com FC estão sob maior risco de desenvolver cirrose biliar por obstrução dos ductos biliares (63).

O uso de enzimas pancreáticas exógenas melhorou o quadro de desnutrição apresentado pelos pacientes com FC (65). As formulações e dosagens de enzimas têm mudado ao longo dos anos (66), porém o princípio permanece o mesmo: fornecimento das amilases, lipases e proteases, enzimas que o pâncreas do paciente com FC é incapaz de produzir adequadamente (67).

B) Manifestações pulmonares

A sobrevivência, conseqüente da melhora da desnutrição causada pela IP

em FC, resultou no aparecimento das afecções pulmonares, sendo hoje o *status* do trato respiratório a principal causa de morbidade e mortalidade da doença (68). Tipicamente, a doença pulmonar é descrita como um ciclo vicioso de retenção de muco, infecção, inflamação e dano ao tecido pulmonar (Figura 7), existindo, contudo, abordagens terapêuticas direcionadas a cada parte desse ciclo (67).

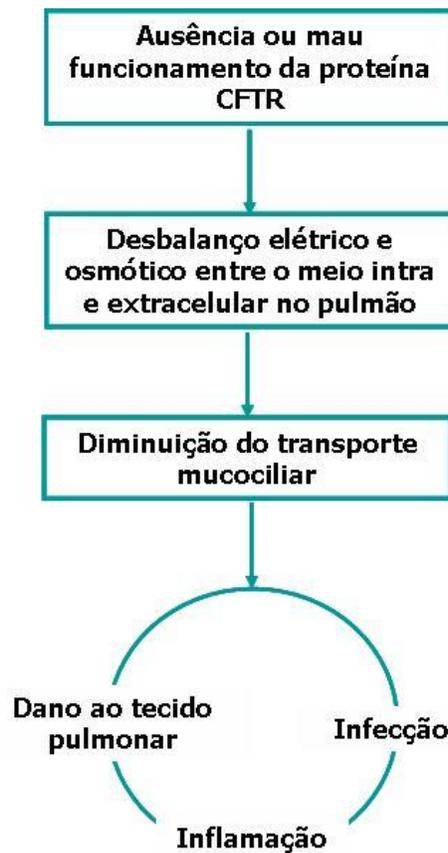


Figura 7. Causas e consequências das manifestações pulmonares presentes na FC, adaptado de Kreindler, 2010 (67).

Os pulmões são anatômica e funcionalmente normais no período intra-útero e nos primeiros meses de vida. Porém ao longo da vida o muco viscoso propicia a infecção e inflamação. A manifestação respiratória mais comum é a tosse crônica

persistente, que pode ocorrer desde as primeiras semanas de vida, perturbando o sono e a alimentação do lactente. Muitas crianças apresentam história de bronquiolite de repetição, síndrome do lactente chiador e infecções recorrentes do trato respiratório, bem como pneumonias de repetição [revisado por Ribeiro et al., 2002 (64)]. A colonização bacteriana secundária à retenção de secreção favorece metaplasia do epitélio brônquico e desorganização da estrutura ciliar. Formam-se rolhas purulentas nos brônquios e bronquíolos, com infiltração linfocitária aguda e crônica. Com a evolução da doença, formam-se bronquiectasias, geralmente após o segundo ano de vida, preferencialmente nos lobos superiores, decorrentes da incapacidade do paciente em esterilizar o trato respiratório e suprimir o processo inflamatório. As complicações incluem, entre outras, hemoptises recorrentes, atelectasias, pneumotórax e fibrose pulmonar (64). As vias aeríferas superiores são comprometidas na totalidade dos pacientes, na forma de pansinusite crônica. A polipose nasal ocorre em cerca de 20% dos pacientes (64).

Para melhorar o transporte mucociliar são utilizadas técnicas de fisioterapia para eliminação do muco das vias aeríferas e uso de mucolíticos. Inalações com solução hipertônica têm mostrado bons resultados na melhora do quadro osmótico do microambiente das vias aeríferas [revisado por Kreindler, 2010 (67)].

Os anti-inflamatórios podem ser usados para a melhora do quadro inflamatório, porém seus efeitos colaterais tornam o uso frequente inadequado [revisado por Kreindler, 2010 (67)]. A azitromicina tem sido usada como medicamento anti-inflamatório e tem mostrado bons resultados na melhora da

função pulmonar em pacientes que são cronicamente infectados por *Pseudomonas aeruginosa* (69).

A antibioticoterapia tem sido um tratamento que aumenta a sobrevivência na FC. Os antibióticos podem ser administrados oralmente, via intravenosa ou por inalação e são geralmente direcionados ao tipo de microrganismo que está presente no escarro do paciente e sua resistência. A administração do antibiótico pode ser feita na fase aguda de exacerbação pulmonar ou de forma crônica para pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa* [revisado por Kreindler, 2010 (67)].

C) Outras manifestações clínicas

A proteína CFTR tem a função de reabsorver o cloro da luz das glândulas sudoríparas. O mau funcionamento ou sua ausência causa o aumento da concentração de cloreto no suor e a hiperatividade do ENaC, com consequente aumento de sódio (70). O teste de cloreto no suor é o mais utilizado para fazer o diagnóstico de FC (63) e é realizado por uma técnica bem estabelecida de iontoforese sob estimulação de pilocarpina e determinação quantitativa de concentrações de sódio e cloreto no suor (6). A figura 8 mostra os valores utilizados para o diagnóstico, bem como as possíveis causas para testes falso-positivos ou falso-negativos.

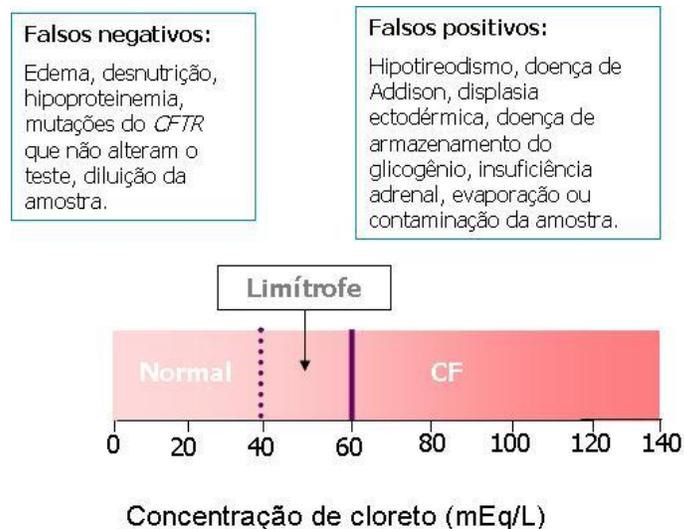


Figura 8. Valores de concentração de cloreto no suor para diagnóstico de FC e as possíveis causas de resultados falsos, adaptado de Davis, 2006 (2) e O'Sullivan e Freedman, 2009 (63).

Pacientes com FC do sexo masculino, em sua maioria, apresentam comprometimento reprodutivo, devido à agenesia bilateral do vaso deferente (CBAVD, do inglês *Congenital bilateral absence of the vas deferens*). Bem no começo da vida, o vaso deferente torna-se entupido por secreções viscosas e é reabsorvido, deixando o paciente sem essa estrutura. Mulheres com FC apresentam muco cervical espesso, fato que também pode prejudicar a fertilidade (2).

Outras complicações comuns aos pacientes são o desenvolvimento de diabetes, cuja incidência aumenta com o aumento da idade, e a perda excessiva de sais pelo suor que pode levar a alcalose metabólica e prostração no calor (2). Um resumo dos fenótipos mais prováveis relacionados ao nível de expressão da CFTR funcional está ilustrado na figura 9.

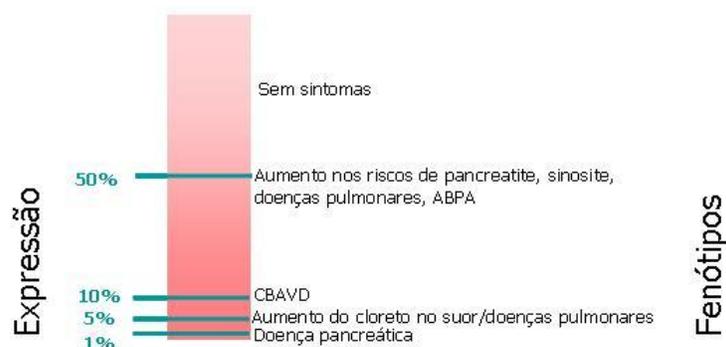


Figura 9. Relação entre a expressão de CFTR funcional e os fenótipos prováveis, adaptado de Davis, 2006 (2).

6. FC: a mudança no panorama demográfico

A) Importância da atenção à transição da pediatria ao atendimento ao adulto

Quando a FC foi descrita, a vida dos pacientes era curta e dolorosa. Contudo, à medida que casos menos graves foram sendo reconhecidos, os antibióticos começaram a ser amplamente usados, os suplementos pancreáticos se tornaram disponíveis e se iniciou um tratamento agressivo dos sintomas, tanto a duração como a qualidade de vida dos pacientes, melhoraram (figura 10) (2).

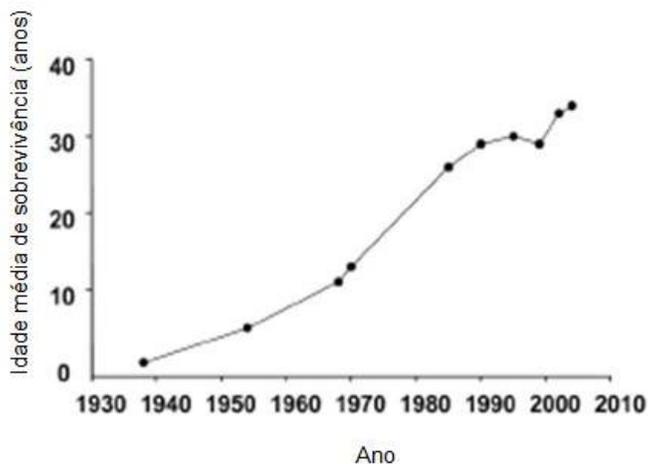


Figura 10. Idade média de sobrevivência de pacientes com FC ao longo dos anos desde a descrição da FC, adaptado de Davis, 2006 (2).

Atualmente, embora as crianças com FC tomem muitos medicamentos, tenham que se submeter a uma dieta hipercalórica e utilizar suplementos alimentares, fazer exercícios e fisioterapia, elas geralmente ficam fora do hospital, vão à escola e vivem, até certo ponto, vidas normais. Em 2005, mais de 35% dos pacientes com FC apresentavam idade maior que 18 anos (2) e há perspectiva que pacientes com FC nascidos na década de 90 viverão até os seus 40 anos e os que estão nascendo agora com a doença tenham expectativa de vida de 50 anos (71, 72). Assim, muitos fibrocísticos vão precisar de atenção médica orientada a adultos durante a sua vida (73), pois esse processo de transição coincide com a época da adolescência ou primeira fase da idade adulta, quando a função pulmonar deve estar piorando e a carga de tratamento bem como as complicações da doença multissistêmica, aumentando (71, 74, 75). Os desafios psicossociais comuns aos adolescentes, incluindo o desenvolvimento de habilidades individuais, são ampliados no cenário de uma doença crônica e podem levar a dificuldades como a aderência ao tratamento e o autocuidado. Portanto, manter a qualidade de vida e aumentar o tempo de vida são desafios contínuos para os pacientes, seus familiares e médicos. Com o diagnóstico precoce cada vez mais comum após implantação ampla de testes de triagem neonatal da FC pelo mundo, o surgimento de terapias mais eficientes, a atenção multiprofissional e a aderência ao tratamento pelos pacientes, o número de adultos com FC tem aumentado continuamente (Figura 11) e, certamente, a visão de como fazer a transição do atendimento da pediatria ao cuidado com o adulto, bem como quais os novos

aspectos clínicos e psicossociais surgem dessa mudança demográfica, precisarão acompanhar esse novo cenário.

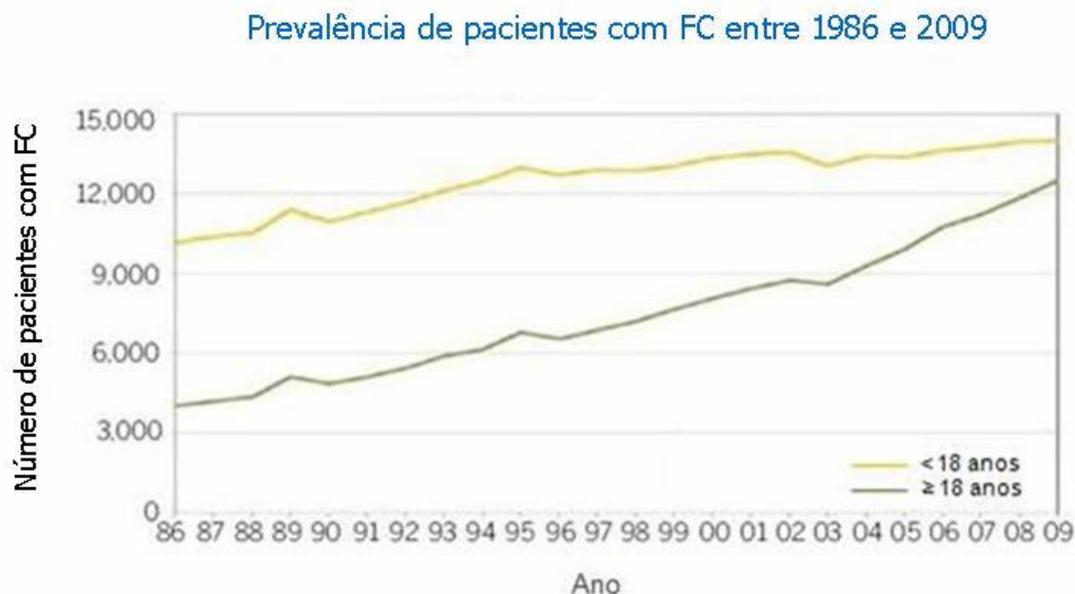


Figura 11. Prevalência de pacientes com FC, pediátricos e adultos, entre 1986 e 2009. Adaptado de Patient Registry Annual Report, CFF, 2009 (71).

B) Adultos com FC

A maioria dos adultos com FC é diagnosticada ao nascimento ou na primeira infância, com quadros sugestivos, como sintomas respiratórios persistentes, desnutrição ou pouco ganho de peso, esteatorréia, entre outros. Contudo, em aproximadamente 5% dos casos, o diagnóstico não é realizado até a idade adulta, quando exames de radiografia de tórax mostram alterações difusas e mudanças no parênquima pulmonar (76). Evidências da disfunção da CFTR e um cenário clínico apropriado são a base do diagnóstico nesses casos. O teste de cloreto no suor superior a 60mEq/L geralmente indica funcionamento anormal de CFTR. Alternativamente, diferenças no potencial nasal e retal podem acessar a atividade

de CFTR. A genotipagem das mutações em *CFTR* podem também levar ao diagnóstico de casos mais atípicos. Porém, apesar dos testes disponíveis, alguns pacientes ainda permanecem sem diagnóstico definitivo, evidenciando os problemas em se considerar a FC como uma doença “tudo-ou-nada” (76). Os pacientes cujos testes diagnósticos são pouco convincentes e que ainda assim têm quadros clínicos que se assemelham a FC, devem ser tratados como FC. Nos casos nos quais há apresentações clínicas atípicas, por outro lado, os pacientes podem nunca precisar do tratamento padrão para FC (76).

7. Justificativa

A mudança demográfica dos pacientes com FC suscitou novos desafios já que o grupo de adultos, cada vez mais numeroso, apresenta necessidades diferentes, sejam elas psicológicas, sociais ou médicas. O levantamento de informações sobre a doença nesse grupo pode trazer um melhor entendimento das necessidades do paciente e uma melhor formação dos profissionais que prestam assistência.

O avanço de pesquisas que visam identificar fármacos mutação-dirigidos que aumentam a produção de CFTR ativa ou melhoram a sua atividade, mostra a importância cada vez maior de se ter um método de genotipagem eficiente e um algoritmo de execução adequado. A caracterização genética de pacientes adultos pode levar, por exemplo, ao diagnóstico molecular mais direcionado, começando pela pesquisa de mutações que se mostraram mais frequentes, ou associadas a

determinado quadro clínico.

O levantamento de informações clínicas e moleculares pode ajudar a entender a grande variabilidade de expressão na FC e diminuir a dificuldade de diagnóstico, principalmente de casos atípicos de FC.

A caracterização clínica, fisiológica e molecular de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC é, portanto, de grande relevância, uma vez que pode trazer informações valiosas tanto para os pacientes, como para os profissionais que atuam em sua assistência.

2. OBJETIVO

A pesquisa teve como objetivo a caracterização dos aspectos clínicos, fisiológicos e moleculares de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística e a correlação entre eles.

Para tanto, os objetivos específicos foram: em pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística:

- identificar as relações entre os marcadores clínicos de gravidade, como função pulmonar, índice de massa corporal, idade ao diagnóstico, insuficiência pancreática, entre outros;
- genotipar o gene *CFTR* e relacionar as classes de mutações encontradas aos marcadores de gravidade;
- avaliar as medidas da corrente intestinal através da micro-câmara de Ussing como método diagnóstico da FC;
- determinar a atividade da proteína CFTR e relacionar com as classes de mutação no gene *CFTR*;
- relacionar a atividade da proteína CFTR a marcadores de gravidade clínica.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

As etapas de ação desse estudo do tipo corte transversal, estão ilustradas na figura 12 e serão apresentados detalhadamente nas sessões seguintes.

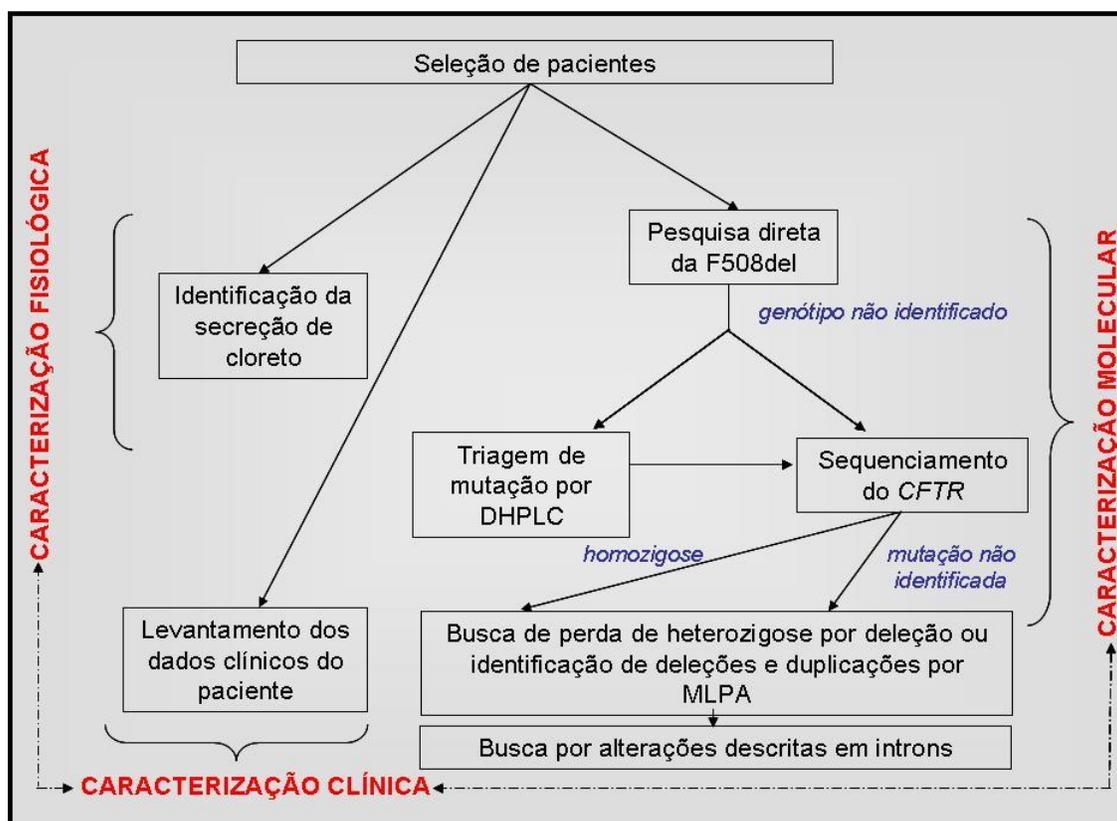


Figura 12. Fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.

1. Seleção e caracterização clínica dos pacientes:

A) Seleção de pacientes

Participaram da pesquisa trinta pacientes com hipótese diagnóstica de fibrose cística (Quadro 1) realizada pelos profissionais responsáveis pelo atendimento no HC/UNICAMP e que obedeciam aos seguintes critérios:

- idade superior a 18 anos
- fornecer o consentimento livre e esclarecido, conforme prevê resolução 196/96 que regula a ética em pesquisa em seres humanos.

O grupo de pacientes convocados foi indicado por profissionais do Ambulatório de Mucoviscidose ou pelo Ambulatório de Pneumologia de Adultos e não corresponde ao total de pacientes maiores de 18 com hipótese diagnóstica de FC. Todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram incluídos na amostra. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CEP Nº 503/2007, Anexo 1).

Quadro 1. Aspectos clínicos dos pacientes com hipótese diagnóstica de FC.

Código	Iniciais	Data nascimento	Idade em 30/08/2011	S e x o	Aspectos clínicos sugestivos de FC
113/00	L. F. A.	19/01/1993	18	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Tosse produtiva desde três anos de idade.
694/00	E. H. L.	05/12/1992	18	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Chiado no peito desde o nascimento.
236/01	L.H.F.	18/01/1987	29	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Esteatorréia e dificuldade de ganho de peso. Pneumonias de repetição.
411/01	P.D.R.	19/03/1982	29	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Tosse produtiva desde um ano e pneumonias na infância.
535/01	V.A.M.	15/02/1974	37	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diagnóstico realizado com dois anos de idade.
582/01	R.A.S.	30/01/1973	38	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diarréia de repetição até os quatro anos e pneumonias de repetição.
589/01	L. H. P.	09/09/1986	24	M	Dois testes de cloreto no suor alterados.
644/01	L.S.M.	23/10/1989	21	F	Um teste de cloreto no suor alterado e outro limítrofe. Quadro pulmonar e digestivo desde os onze meses.
775/01	E.G.A.	06/07/1982	29	M	Um teste de cloreto no suor alterado e outro limítrofe. Pneumonia de repetição desde os onze meses.

Código	Iniciais	Data nascimento	Idade em 30/08/2011	S e x o	Aspectos clínicos sugestivos de FC
813/01	D. S. C.	08/05/1991	20	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diagnóstico realizado com um ano e três meses de idade.
973/01	A. O.	19/11/1990	20	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diagnóstico realizado com quatro anos de idade.
715/02	R.F.L.	20/10/1973	37	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diagnosticado aos 7 meses.
719/02	T. V. P.	21/12/1983	27	M	Um teste de cloreto alterado no suor. Pneumonias de repetição a partir de um mês.
198/03	M.A.M.	04/09/1981	29	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Tosse crônica desde os quatro meses.
2459/04	R.C.	22/12/1982	28	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Atendido desde dois meses por história familiar sugestiva de FC.
501/05	J.V.R.A.	15/06/1985	19	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Desde dois meses apresentou vários episódios de chiado no peito com atraso em ganho de peso e altura.
790/05	A.A.P.	12/01/1974	37	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Bronquiectasias e insuficiência respiratória.
1322/05	A.P.B.	08/01/1986	25	F	Diagnosticada com dois anos e meio de idade.
404/06	C.S.	15/05/1979	32	M	Diagnóstico de FC desde os doze anos, insuficiência pancreática.
856/06	M.R.I.	30/01/1991	20	M	Dois testes de cloreto no suor alterados. Hipótese diagnóstica com dez anos de idade.
456/07	K.K.S.B.M.	08/12/1987	23	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Tosse produtiva desde a infância.
484/07	O. R. F.	07/05/1975	36	M	Sintomas respiratórios desde os doze anos. Bronquiectasias.
173/08	B. S. C.	04/03/1986	25	M	Teste de cloreto no suor alterado. Apresentou sintomas respiratórios e digestivos desde o nascimento.
175/08	L.S.	04/10/1976	34	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Tosse produtiva.

Código	Iniciais	Data nascimento	Idade em 30/08/2011	S e x o	Aspectos clínicos sugestivos de FC
331/08	J.S.V.	12/06/1990	21	M	Um teste de cloreto no suor alterado e outro normal. Crise intensa de bronquiospasma.
260/09	D.R.	05/05/1976	35	F	Dois testes de cloreto no suor alterados, tosse produtiva desde o primeiro mês de vida.
554/09	C.S.S.	08/03/1976	35	F	Dois testes de cloreto no suor alterados, polipose nasal.
616/10	A. C. B.	13/06/1960	51	M	Teste de cloreto no suor alterado. Filha com FC concebida por fertilização <i>in vitro</i> .
841/10	A. G.	30/09/1975	35	F	Dois testes de cloreto no suor de valor alterado.
68/11	B. B. R. J.	01/05/1968	43	F	Dois testes de cloreto no suor alterados. Diagnóstico realizado com oito anos de idade.

Foram considerados alterados os valores de cloreto no suor superiores a 60mEq/L.

A fim de obter valores de secreção de cloro a partir das medidas de corrente intestinal em indivíduos sem FC, ou seja, que apresentam atividade de CFTR normal, foram convidados a participar da pesquisa indivíduos controles sadios. Esses dados têm a finalidade de ilustrar o padrão de normalidade de secreção de cloreto pela CFTR, não sendo usados nas correlações posteriores, uma vez que as correlações serão realizadas entre os pacientes com FC.

O grupo de referência foi constituído de pessoas submetidas à colonoscopia para avaliação de outras condições que, assim como os pacientes, consentiram em participar da pesquisa, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram excluídos como controle aqueles que apresentaram como resultado da colonoscopia doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn. Os dados dos indivíduos estão resumidos no Quadro 2.

Quadro 2. Caracterização do grupo de referência.

Iniciais	Data nascimento	Idade em 30/08/2011	Sexo
C. M. A.	21/03/1991	20	F
C. S. O.	29/03/1996	15	M
M. A. D. P.	02/10/1956	54	F
N. C. S.	06/05/1958	53	F
B. H. B.	29/07/1991	20	M
J. B.	08/09/1999	11	M

B) Caracterização clínica

A caracterização clínica foi obtida pela análise dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/UNICAMP). Os dados de função pulmonar foram obtidos com auxílio da Dra. Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro, fisioterapeuta responsável pelo Laboratório de Fisiologia Pulmonar (LAFIP) do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED), ou de sua equipe.

Conforme revisado por Dentini (2010) (77), a intensidade da lesão pulmonar pode ser avaliada sob os aspectos clínicos e morfológicos por análise de tomografia computadorizada de tórax, ou aspectos funcionais por meio de testes de avaliação da função pulmonar, como a espirometria.

Escores de avaliação da gravidade da FC foram desenvolvidos com a finalidade de caracterizar e avaliar o curso da doença. O escore clínico mais utilizado é o Escore de Shwachman e Kulczycki (1958) (78), que avalia a gravidade por quatro diferentes critérios: a atividade geral, nutrição, exame radiológico e avaliação física. Esse escore é graduado em excelente (86 a 100), bom (71 a 85),

médio (56 a 70), moderado (41 a 55) e grave (40 ou menos) e foi realizado por três diferentes profissionais do Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

A morfologia da lesão pulmonar pode ser avaliada pela tomografia computadorizada e alguns estudos têm sugerido que esse exame seja inserido como rotina no acompanhamento de pacientes com FC (79, 80). O escore mais frequentemente utilizado é o de Bhalla (1991), que avalia a presença de anormalidades como espessamento peribrônquico, bronquiectasias, bolhas, *pluggs* de secreções, colapsos e consolidações, enfisema, entre outros (81).

A deterioração pulmonar leva ao declínio progressivo e irreversível da função pulmonar que resulta na mudança dos volumes pulmonares e da capacidade pulmonar total. As medidas de capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF (VEF_1) e o fluxo expiratório entre 25 e 75% ($FEF_{25\%-75\%}$) podem estar dentro da normalidade no início da doença. A alteração mais precoce é a diminuição de $FEF_{25\%-75\%}$, como resultado do comprometimento das pequenas vias aéreas. Com a evolução da doença, as grandes vias aéreas podem ser acometidas, o que resulta em diminuição do VEF_1 e da relação entre VEF_1 e CVF (Índice de Tiffeneau). O Índice de Tiffeneau menor que 80% evidencia distúrbio ventilatório obstrutivo e abaixo de 60%, distúrbio ventilatório obstrutivo de maior gravidade (77, 80, 82, 83). O parâmetro mais utilizado para avaliar o declínio da função pulmonar é o VEF_1 (84, 85), já que quanto maior a obstrução, menor a capacidade de liberar o ar dos pulmões no

primeiro segundo.

A saturação transcutânea de oxigênio (SpO₂) reflete a oxigenação do sangue e tem como finalidade avaliar a necessidade de prescrição de oxigênio suplementar. Indivíduos que apresentam níveis de saturação maiores de 95% são considerados com suprimento adequado de O₂. Valores de SpO₂ menores que 95 são sinal de hipoxemia: leve (entre 91 e 95%), moderada (entre 85 e 90%) e grave (menor que 85%). De forma indireta, a baixa saturação indica a progressão do acometimento pulmonar.

Outro marcador de gravidade da FC é a desnutrição, que pode ser avaliada por meio da determinação do índice de massa corporal (IMC) dado pela razão entre o peso do paciente (em Kg) e o quadrado da altura (em m).

2. Material biológico:

Os materiais biológicos utilizados na pesquisa consistiram de DNA, extraído a partir de sangue periférico, para a caracterização das alterações moleculares e de espécimes da superfície da mucosa retal para avaliação da secreção de íons cloreto.

A coleta de sangue foi realizada pela punção venosa, por profissionais treinados, em tubo contendo 54µL de EDTA a 15% para prevenir coagulação. O sangue foi encaminhado à temperatura ambiente para o Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, onde foi realizada a extração de DNA pelo método de fenol-

clorofórmio [estabelecido no mesmo laboratório (Anexo 2)] e as análises moleculares subsequentes.

Os espécimes de tecido superficial de mucosa retal foram obtidos por biópsia com fórceps (2-3mm de diâmetro) realizada pela Dra. Maria de Fátima Servidoni do Serviço de Endoscopia Pediátrica do Hospital das Clínicas UNICAMP. Trata-se de um procedimento indolor e sem risco para o paciente. As amostras foram armazenadas em tampão PBS gelado e transportado em gelo até a sala experimental no Laboratório de Eletrofisiologia do Núcleo de Medicina Experimental da UNICAMP.

3. Caracterização molecular:

A) Pesquisa direta da mutação F508del

A identificação da mutação F508del no gene *CFTR* foi a primeira etapa a ser realizada para a caracterização molecular uma vez que a frequência esperada nos pacientes com FC da região metropolitana de Campinas é de 50% dos alelos (37). Como se trata de uma deleção de 3pb no exon 10 do gene *CFTR* (Figura 13), a análise molecular foi realizada apenas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de amplificar a região que contém a alteração, seguida de eletroforese (2 horas/200V) em gel não desnaturante de poliacrilamida a 12%. A PCR foi realizada utilizando como iniciadores senso e antissenso 5'-GGCACCATTAAAGAAAATATC-3' e 5'-TGGCATGCTTTGATGACGC-3', respectivamente. As condições da PCR foram as seguintes: 5 minutos de

desnaturação inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53,5°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 2 minutos, com extensão final à 72°C por 10 minutos. A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo 50ng de DNA do paciente, 10 picomoles de cada iniciador, 1,5U de Taq DNA polimerase e concentrações finais de tampão 1X com KCl [50mM de KCl; 10mM de Tris-HCl pH8,4; 0,08% (v/v) de Nonidet P40], 50µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1mM de MgCl₂. As reações sempre foram realizadas em paralelo com controle sem DNA (branco) com a finalidade de identificar possíveis contaminações.



GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC ATC TTT GGT GTT TCC TAT GAT GAA
TAT AGA TAC AGA AGC GTC ATC AAA GCA TGC CA

Figura 13. Fragmento amplificado para análise da mutação F508del. Sublinhado, a região de anelamento dos iniciadores. Em destaque, as bases deletadas características dessa alteração molecular.

Os resultados esperados na eletroforese para os genótipos homocigoto F508del, heterocigoto ou sem essa alteração molecular são respectivamente aqueles que apresentaram somente bandas de 74pb, bandas de 77 e 74pb, e somente bandas de 77pb, como mostra a figura 14. Em pacientes heterocigotos, é esperado ainda que apareça uma banda com padrão de migração mais lento na eletroforese. Essa banda é constituída por heteroduplex, estrutura formada de fragmentos compostos pela fita simples senso de 77pb e antissenso de 74pb, ou vice-versa, durante os processos de aumento e diminuição da temperatura característicos da reação em cadeia da polimerase. No caso desse fragmento, o heteroduplex tem estrutura secundária diferente da estrutura α -hélice clássica do

DNA dupla-fita, o que resulta em padrão de eletroforese diferenciado.

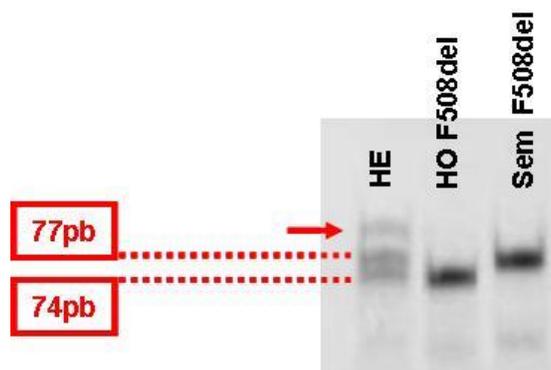


Figura 14. Padrões esperados na análise da mutação F508del. Onde HE=heterozigoto, HO=homozigoto e seta indica fragmento heteroduplex.

B) Amplificação dos fragmentos contendo as regiões codificantes do gene *CFTR* e as junções intron/exon

A segunda etapa da caracterização molecular foi realizada em pacientes que não apresentaram a alteração F508del em homozigose e consistiu na amplificação de toda a porção codificadora do gene *CFTR*, bem como das junções intron/exon importantes no processamento do RNA mensageiro. Essa reação precede tanto a análise por DHPLC, como por sequenciamento de DNA. Como descrito na sessão de introdução, o gene *CFTR* é composto por 27 exons, porém como o exon 13 possui grande dimensão, ele foi amplificado em dois fragmentos (13.1 e 13.2), com sobreposição entre os fragmentos. As condições ideais para a amplificação de cada um dos 28 fragmentos foram otimizadas para o volume final de 50µL de reação contendo 50ng de DNA do paciente, 10 picomoles de cada iniciador, 1,5U de Taq e concentrações finais de 1,5mM de MgCl₂, 80µM de cada desoxirribonucleotídeo e tampão 1X com KCl [50mM de KCl; 10mM de Tris-HCl

pH8,4; 0,08% (v/v) de Nonidet P40] ou 1X tampão com (NH₄)₂SO₄ [20mM de (NH₄)₂SO₄; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20] quando mais apropriado. As reações sempre foram realizadas em paralelo com o controle branco. Dois métodos de ciclagem de temperatura foram utilizados e estão esquematizados na figura 15.

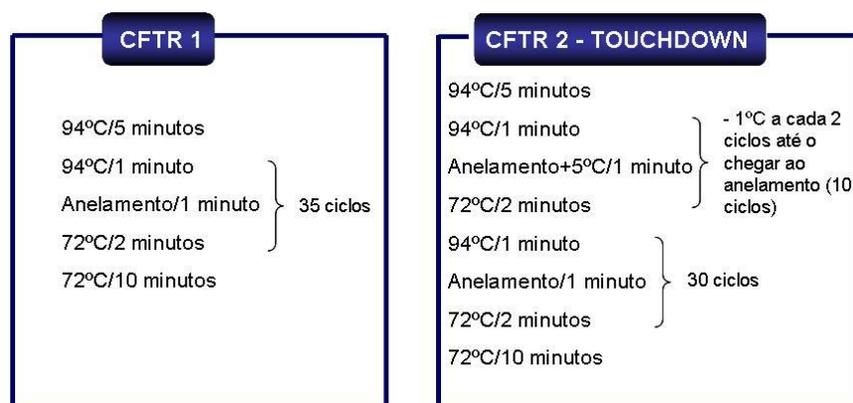


Figura 15. Métodos utilizados nas diferentes reações de amplificação realizadas para a análise do gene *CFTR*.

A sequência dos iniciadores, temperaturas de anelamento, o tampão, métodos utilizados e o tamanho dos fragmentos gerados pela PCR estão resumidos no Quadro 3.

Quadro 3. Especificações das condições para amplificação dos fragmentos para a caracterização molecular.

Fragmentos contendo os exons	Iniciadores (5'-3')	Programa CFTR	Tampão	T. de anelamento	Tamanho (pb)
1	S: CGT AGT GGG TGG AGA AAG C AS: CCT TTA CCC CAA ACC CAA CC	1	(NH ₄) ₂ SO ₄ *	64,6	392
2	S: ATT CCA AAT CTG TAT GGA GAC C AS: GTT GGG ATT ACA GGC ATT AGC	2	KCl	60,5	315
3	S: AGA TAT CTG GCT GAG TGT TT AS: TGT GAT ACA TAA TGA ATG TAC	1	KCl	56	318

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

Fragmentos contendo os exons	Iniciadores (5'-3')	Programa CFTR	Tampão	T. de anelamento	Tamanho (pb)
23	S: GTG GCT AAC GCT ATA TCA AC AS: ACA TGG CTC AGA TCA AAG TG	2	KCl	59,5	436
24	S: GGA CAC AGC AGT TAA ATG TG AS: CAT GTC AAC ATT TAT GCT GC	1	KCl	63	386

Onde T= temperatura, S= iniciador senso, AS= iniciador antissenso, pb=pares de bases e * significa adição de 5% de DMSO na reação.

Após a amplificação, a qualidade da reação foi avaliada através de aplicação de 3µL da PCR em gel de agarose a 1,5% (80V/30minutos). Os fragmentos foram então avaliados por DHPLC e/ou por sequenciamento automático.

C) Cromatografia líquida desnaturante de alta resolução – DHPLC (do inglês, *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*)

A cromatografia líquida desnaturante de alta resolução permite detecção de alterações de uma única base ou pequenas deleções e inserções de forma rápida e sensível (86). Ela se baseia na propriedade de formação de heteroduplex por fragmentos heterozigotos após desnaturação e renaturação lenta e no diferente padrão de retenção dentro de uma coluna cromatográfica do heteroduplex quando comparado ao homoduplex, utilizando a técnica de cromatografia líquida de par iônico e fase reversa. Ravnik-Glavac e colaboradores (2002) (87) concluíram que o método de DHPLC obteve sensibilidade de 100% para as alterações moleculares no gene *CFTR* e, portanto, representa uma das técnicas de triagem mais adequadas para a identificação de mutações em fibrose cística. Trata-se de um

método que identifica em qual dos fragmentos se localiza a alteração, porém sem identificar qual é essa alteração. Para isso, os fragmentos com padrão de retenção alterado devem ser submetidos à sequenciamento de DNA.

A análise por DHPLC foi realizada no Laboratório de Genética Humana do Centro de Genética Humana/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge vinculado à Universidade de Lisboa sob a supervisão da Dra. Anabela Ramalho e os pacientes, bem como os fragmentos estudados por esse método, estão resumidos no Quadro 4.

Quadro 4. Pacientes submetidos à análise por DHPLC.

Código	Proporção avaliados/total	Exons analisados por DHPLC
694/00	8/28	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
411/01	6/28	1, 3, 4, 11, 16, 20
535/01	13/28	3, 4, 5, 6b, 7, 11, 12, 13.1, 16, 18, 19, 20, 22
644/01	8/28	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
775/01	8/28	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
198/03	7/28	1, 3, 4, 7, 11, 18, 20
501/05	13/28	1, 3, 4, 5, 6b, 7, 11, 12, 13.1, 16, 18, 19, 22
790/05	11/28	1, 2, 3, 4, 5, 6b, 7, 11, 13.1, 19, 20
404/06	15/28	1, 2, 3, 4, 5, 6b, 7, 11, 12, 13.1, 14a, 16, 18, 19, 20
856/06	14/28	1, 2, 3, 4, 5, 6b, 7, 11, 12, 13.1, 16, 19, 20, 22
456/07	10/28	1, 3, 4, 5, 7, 11, 13.1, 16, 18, 20

A análise foi realizada da seguinte forma: após a PCR, os fragmentos foram submetidos à desnaturação por 5 minutos a 95°C e deixados à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 45 minutos, para propiciar formação de heteroduplex em fragmentos onde a heterozigose estava presente. Foram injetados no sistema 5µL de amostra sob vazão de 0,75mL por minuto. As análises foram realizadas em DHPLC modelo Transgenomics WAVE® System 4500, com a

coluna DNasep® como fase estacionária.

Cada sequência amplificada foi submetida em análise no Software Navigator™ visando estabelecer as temperaturas de análise onde ocorre interação ideal com a coluna foram determinadas (Quadro 5). A maioria dos fragmentos precisou de mais de uma condição de análise pelo DHPLC para a cobertura de toda a sequência de bases. Isso acontece porque é preciso escolher uma temperatura de análise que proporciona fração helicoidal entre 0,70 e 0,97, para que o padrão de retenção de um fragmento que possui uma alteração em heterozigose seja diferente de um fragmento que possui homozigose. A figura 16 exemplifica essa necessidade. De acordo com a figura 16B a temperatura de análise de 56°C permite a análise dos primeiros 160pb do fragmento que contém o *exon 2* e as temperaturas de 52,5 e 54°C, dos últimos 155pb. O gráfico da Figura 16A permite calcular um fator de correção para a análise cromatográfica, chamado de "*time shift*." Esse fator leva em consideração a relação entre a fração helicoidal e a *T melting* (T fusão) em cada temperatura de análise e altera a concentração dos reagentes da fase móvel para dar maior sensibilidade a diferenciação entre heterozigose e homozigose.

Quadro 5. Temperaturas de análise em DHPLC e fator de correção (*Time Shift*) para cada fragmento amplificado.

Exon	Condição 1		Condição 2		Condição 3		Condição 4	
	T (°C)	Time Shift						
1	62,0	1,02	62,5	2,42	-	-	-	-
2	53,0	0,32	54,0	1,12	56,0	1,96	-	-
3	53,0	0,21	56,0	1,37	-	-	-	-
4	56,0	1,12	57,0	1,54	58,0	1,96	-	-

Exon	Condição 1		Condição 2		Condição 3		Condição 4	
	T (°C)	Time Shift						
5	52,0	0,39	53,0	1,09	54,0	2,07	-	-
6a	54,0	0,14	56,5	1,37	60,0	2,42	-	-
6b	52,0	0,11	53,5	0,67	55,0	2,42	-	-
7	53,0	0,42	58,0	1,89	-	-	-	-
8	53,0	1,19	54,0	2,03	55,5	2,80	-	-
9	53,0	0,18	56,0	1,26	59,5	2,94	-	-
11	54,0	0,60	55,0	1,89	57,0	3,01	-	-
12	54,4	0,35	56,0	2,28	-	-	-	-
13.1	50,0	0,14	55,0	1,12	56,5	2,17	-	-
13.2	56,0	0,84	59,5	2,28	62,0	3,01	-	-
14a	52,0	0,46	55,0	2,42	-	-	-	-
14b	55,3	0,25	57,3	1,72	59,0	3,01	-	-
15	56,0	0,77	57,8	1,82	-	-	-	-
16	53,0	0,53	54,0	1,09	-	-	-	-
17a	52,0	0,14	52,5	0,60	55,5	1,58	57,0	2,24
17b	51,5	0,14	53,5	0,77	55,0	1,89	58,5	2,73
18	54,0	0,77	56,5	2,21	-	-	-	-
19	54,0	0,07	57,5	1,19	58,0	1,75	-	-
20	53,5	0,14	55,5	1,68	57,5	2,17	-	-
21	52,0	0,14	56,5	2,21	-	-	-	-
22	56,5	1,09	59,0	2,63	-	-	-	-
23	54,0	0,11	55,0	0,84	57,0	2,45	-	-
24	60,0	1,54	61,0	2,24	-	-	-	-

O fragmento que contém o exon 10 não está contemplado no Quadro 5 porque apresentou muitos padrões de retenção diferentes mesmo em indivíduos controles e, portanto, foi realizado o sequenciamento automático diretamente a partir da PCR. Esse fragmento possui um polimorfismo muito frequente, o M470V, o que acarretou em padrão de retenção alterado em muitas amostras.

Sequence Context: CFTR
Amplicon: CFTR_Ex2

MELTING PROFILES

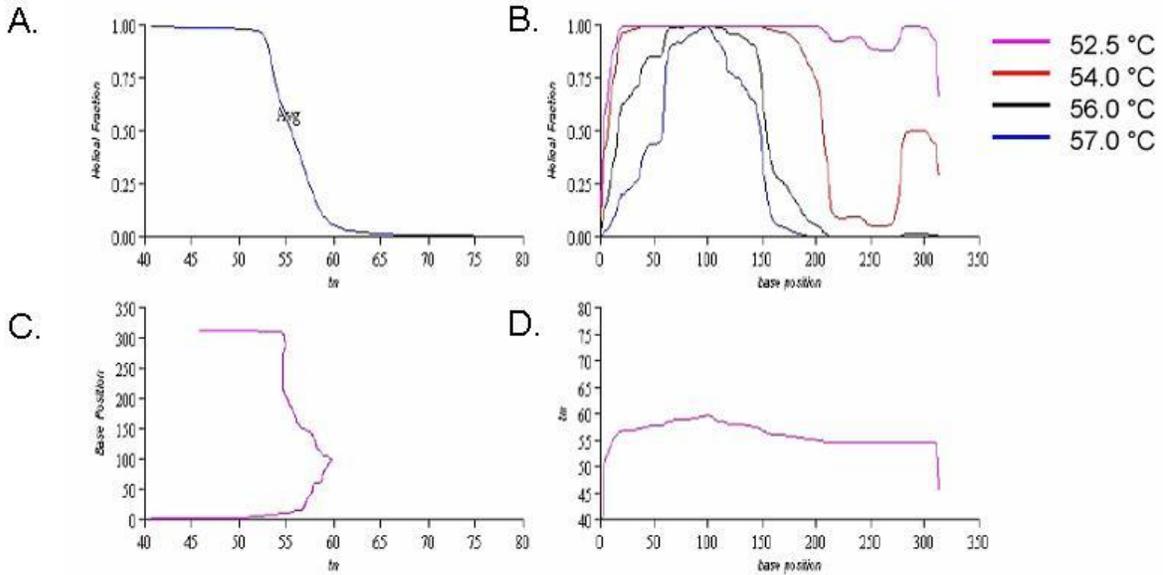


Figura 16. Padrão de fusão (*melting*) do exon 2. A: Fração helicoidal por $T_{melting}$; B: Fração helicoidal pela posição da base; C: Posição da base por $T_{melting}$; D: $T_{melting}$ por posição da base.

As condições ideais descritas na Quadro 5 foram testadas com mutações conhecidas, a fim de avaliar a sensibilidade do método para essas alterações (Quadro 6) (amostras gentilmente cedidas por Margarida D. Amaral, PhD, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

Quadro 6. Acervo de mutações no gene *CFTR* para teste da sensibilidade do DHPLC.

Fragmento que contém o exon	Alterações
1	c.125G>C, p.S4X
2	c.211delC, c.284delA
3	p.E60X, p.R74W, p.R75Q, p.G85E
4	p.R117H, c.574delA
5	c.675delA, c.711+1G>T

Fragmento que contém o exon	Alterações
6b	c.1001+11C>T
7	c.1078delT, c.1248+1G>A
11	c.1717-1G>A, p.G542X, p.G551D
12	p.A561E, p.G576A, c.1898+1G>C
14a	p.W846X
16	c.3041-71G>C, p.I980K
20	p.W1282X, c.4005+29G>C
22	p.I1366T

Em cDNA: A=adenina, T=timina, C=citosina e G= guanina

Na proteína: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, E=ácido glutâmico, F=fenilalanina, G= Glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, N=Asparagina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptofano, Y=tirosina e X=códon de terminação.

Como mostra o Quadro 4, nem todos os pacientes e fragmentos foram analisados pela técnica de DHPLC. Isso ocorreu porque o equipamento alocado no Laboratório de Genética Molecular apresentou problemas técnicos impossibilitando o seu uso. Dessa forma, o restante das análises foi realizado por sequenciamento automático diretamente a partir da PCR.

D) Sequenciamento automático de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas no analisador genético MegaBACE 1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare). As quantidades de reagentes bem como as condições de reação estão descritas na figura 17.



Figura 17. Condições das reações de sequenciamento de DNA para a investigação de mutações no gene *CFTR*.

Todas as reações foram realizadas em duplicata. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram purificadas com etanol e acetato de amônio 7,5M a fim de eliminar didesoxirribonucleotídeos não incorporados, conforme instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas à eletroforese em capilar no analisador genético MegaBACE 1000.

E) MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

Embora a maior parte das alterações descritas como causadoras da FC sejam mutações de ponto ou pequenas deleções e inserções, certo número de casos permanecem não caracterizados. Esses casos podem ser portadores de mutações patogênicas localizadas em introns ou regiões regulatórias que não são rotineiramente investigadas, ou podem ainda ser portadores de rearranjos como grandes deleções ou duplicações que não são detectados pela técnica de sequenciamento de DNA de Sanger (88). Até o momento, 48 grandes duplicações e deleções no gene *CFTR* foram associadas à FC (39).

O kit SALSA® MLPA® P091-C1 *CFTR*, MRC-Holland foi desenhado para

identificar grandes deleções e inserções no gene *CFTR*. A técnica se baseia em sondas que se ligam especificamente a diferentes *loci* dentro do gene, geralmente uma ou mais contemplando cada exon. Na presença de ligação da sonda, o sinal é amplificado e após eletroforese em analisador genético, identificado e quantificado. No gráfico gerado por software específico do analisador genético (Figura 18), a presença de duplicações é detectada por aumento no sinal em um determinado pico e a deleção, na diminuição desse sinal, quando comparado ao grupo de controles. A figura 19 resume as regiões analisadas e o tamanho resultante após amplificação do sinal.

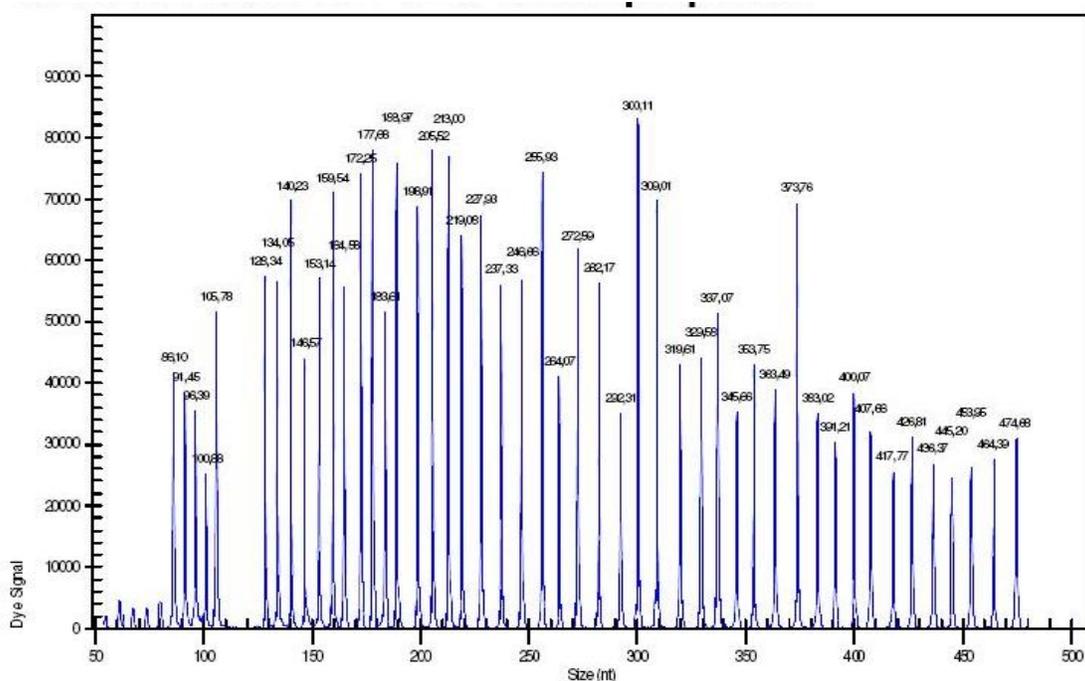


Figura 18. Padrão de eletroforese em capilar de uma amostra de aproximadamente 50ng de DNA humano controle analisado com o kit SALSA® MLPA® P091-C1 CFTR, retirado do Description version 06 (89).

Esse kit dispõe de uma sonda específica para o alelo que não tem a mutação F508del (alelo selvagem). Portanto, além da identificação das possíveis

duplicações e deleções, ele também tem a capacidade de diagnosticar a mutação F508del. Possui ainda controles internos de desnaturação da amostra, qualidade do DNA utilizado e de determinação do sexo, como mostra a figura 19.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	CFTR
64-70-76-82	O-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136	ASZ1 probe 03571-L03264		58 Kb before CFTR
142	CFTR probe 02956-L13079		Exon 14
148	CFTR probe 03042-L03315		Exon 26
154	CFTR probe 02944-L02376		Exon 1
160	CFTR probe 02957-L02389		Exon 15
166	Reference probe 02881-L02348	19q12	
173	CFTR probe 03578-L02939		Exon 27
178	CFTR probe 02958-L02390		Exon 16
184	Reference probe 02882-L02349	19q13	
190	CFTR probe 03574-L02400		Exon 27
198	CFTR probe 02946-L13077		Exon 2
206 †	CFTR probe 02959-L13651		Exon 17
211 †	Reference probe 03791-L05919	21q22	
220	CFTR probe 02947-L02379		Exon 3
227	CFTR probe 02960-L02392		Exon 18
238	CFTR probe 03039-L03312		Exon 1
247	CFTR probe 02948-L02380		Exon 4
256	CFTR probe 02961-L02393		Exon 19
265	Reference probe 02318-L01809	19p13	
274 †	CFTR probe 13916-L15981		Exon 6
283	CFTR probe 02962-L02394		Exon 20
292	CFTR probe 03041-L03314		Exon 13
301 †	CFTR probe 13627-L15081		Exon 7
310	CFTR probe 03576-L13076		Exon 21
319	Reference probe 01866-L01425	1p35	
330 † ∞	CFTR probe 03322-L14978		Exon 11; DF508 WT
339 †	CFTR probe 02951-L13653		Exon 8
346	CFTR probe 03040-L03313		Exon 5
355 †	CFTR probe 13629-L15083		Exon 22
364	CFTR probe 02952-L02384		Exon 9
373 †	CFTR probe 12113-L13013		Exon 1
382	CFTR probe 02965-L02397		Exon 23
391	CFTR probe 02953-L02385		Exon 10
400	Reference probe 02598-L02069	5q35	
409	CFTR probe 02966-L02398		Exon 24
418	CFTR probe 02955-L02387		Exon 12
427	Reference probe 00680-L00121	7q35	
436	CFTR probe 02967-L02399		Exon 25
445	CTTNBP2 probe 03572-L03267		58 Kb after CFTR
454	Reference probe 00605-L00018	15q26	
463	CFTR probe 02954-L02386		Exon 11
472	Reference probe 02757-L02206	11p13	

Figura 19. Localização das sondas e tamanhos dos fragmentos gerados após a amplificação do sinal pelo kit SALSA® MLPA® P091-C1 CFTR, retirado do Description version 06 (89).

Nos casos onde a alteração molecular não foi identificada, foi realizado o ensaio de MLPA, conforme instruções do fabricante, seguindo os passos metodológicos: hibridação das sondas, ligação na presença de hibridação, desnaturação das sondas, amplificação com iniciadores universais, eletroforese em analisador genético e normalização dos dados. O ensaio foi realizado ainda em casos de aparente homozigose a fim de descartar a possibilidade de perda de heterozigose. A análise dos dados foi realizada em planilha de Excel desenvolvida pelo NGRL (*National Genetics Reference Laboratory*, Manchester, UK, www.ngrl.org.uk).

Cinco indivíduos controles sem fibrose cística foram utilizados para a normalização dos dados a cada ensaio, conforme a recomendação do fabricante. Um paciente com fibrose cística portador de duplicação no gene *CFTR* entre os exons 6b e 16, previamente diagnosticado, foi utilizado com controle positivo. A figura 20 exemplifica o padrão normal de MLPA obtida pela análise de um controle normal e o padrão alterado obtido pela análise do paciente portador da duplicação, ambos após normalização.

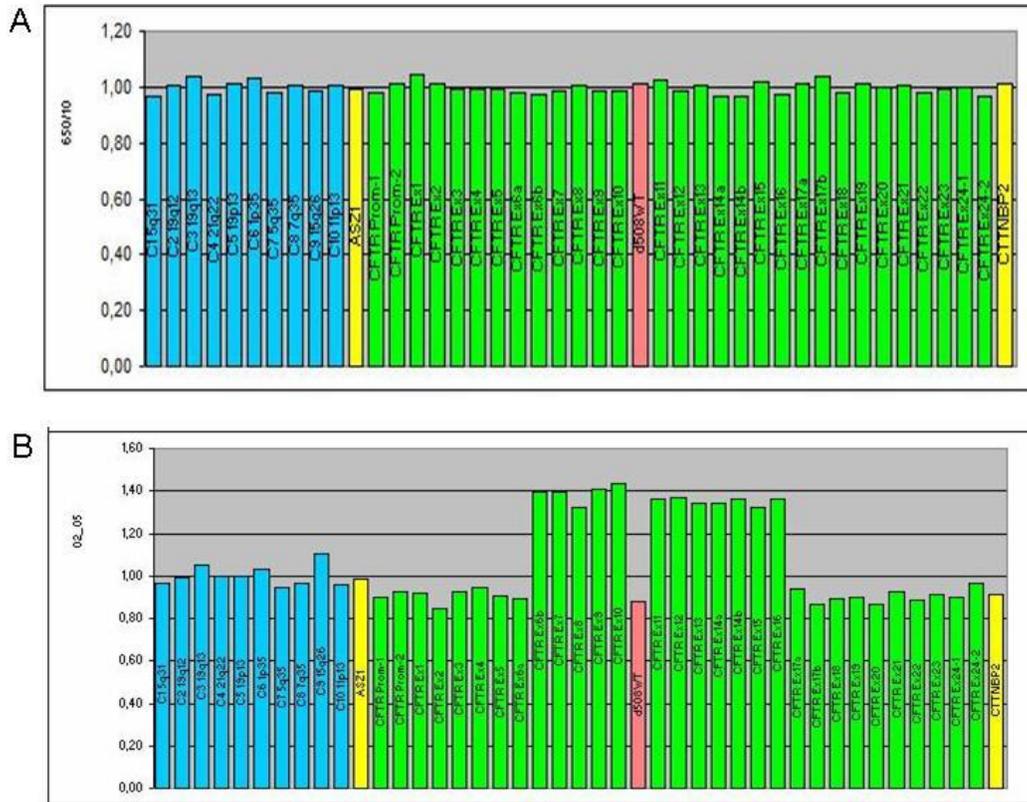


Figura 20. Exemplo de resultados de MLPA. Em A, controle normal e em B, paciente com duplicação entre exons 6b e 16. Em azul, controles genômicos; em amarelo, regiões flanqueadoras do gene *CFTR* (58 Kb); em verde, exons do gene *CFTR*; e em rosa, sonda responsável pela detecção da mutação F508del.

F) Outras alterações

Em casos onde as duas mutações não foram encontradas por nenhum dos métodos descritos anteriormente, foi realizada ainda a pesquisa direta das mutações 1584-18672pb A>G (intron 10) e 3849+10Kb C>T (intron 19). Essas alterações se encontram em sequências intrônicas não contempladas nos fragmentos sequenciados e estão ligadas à formação de sítio de *splicing* alternativo que resulta na produção de menor quantidade da proteína CFTR funcional.

A detecção da mutação 1584-18672pb A>G foi realizada através de amplificação, seguida de sequenciamento automático (Figura 21). A PCR foi

realizada utilizando como iniciadores senso e antissenso 5'-GCCAAGTTATTGTACAGTTGACC- 3' e 5'- TGACCAGAAGCCTTACTGATAAC -3', respectivamente, descritos por Costantino e colaboradores (2010) (90). As condições de PCR foram as seguintes: programa CFTR2-TOUCHDOWN (Figura 17) com temperatura de anelamento final de 54°C. A reação foi realizada em volume final de 50µL, contendo 50ng de DNA do paciente, 10 picomoles de cada iniciador, 1,5U de Taq e concentrações finais de 1,5mM de MgCl₂, 80µM de cada desoxirribonucleotídeo, tampão 1X com (NH₄)₂SO₄ [20mM de (NH₄)₂SO₄; 75mM de Tris-HCl pH8,4; 0,01% (v/v) de Tween 20]. As reações sempre foram realizadas em paralelo com o controle branco. Em seguida, foi realizado o sequenciamento automático de DNA, conforme descrito da seção D desse capítulo.

GCCAAGTTATTGTACAGTTGACCTTTGAACAACACGGGTTTGA
 TGCAGGTCCACTTACACGTATTTTTTTTTTCCGTTTCTGACACCCCT
 AAGGCAACAAGGCCAACTCCTCCCCTTGCTCTTCCTCCTCAGCTGA
 CTCAACATGAAAATGAGGACGAAGACCTTTATGAAGATTCACCT
 CCACTTAATGAATAGTAC(A/G)ATTTCTTTTTCCCATGGTTTTCTTA
 ATAACATTTTCTTTTCTCTAGCTTGCTTTATTGTAATAATATAGTAT
 AATACATATAACATACCAAGTATGTGTTAATTGACTGCTTATGTTATC
AGTAAGGCTTCTGGTCA

Figura 21. Detalhamento da análise da mutação 1584-18672pb A>G ilustrando o fragmento amplificado (em vermelho, os possíveis alelos).

A detecção da mutação 3849+10Kb C>T foi realizada através de amplificação, seguida de digestão com a endonuclease de restrição *Hph* I. A PCR foi realizada utilizando como iniciadores senso e antissenso 5'-GAATCATTAGTGGGTATAAGCAG- 3' e 5'- AGGCTTCTCAGTGATCTGTTG -3', respectivamente. Foi utilizado o mesmo procedimento para amplificar o fragmento que contém o exon 3, descrito na sessão 3B. A digestão foi realizada adicionando

5U da endonuclease e 10% (v/v) do tampão que acompanha a enzima a 10µL da reação da PCR. A digestão foi realizada a 37°C/16 horas e os resultados avaliados em gel não desnaturante de poliacrilamida a 12% (200V/2 horas). A figura 22 ilustra a sequência amplificada para a análise e os tamanhos de fragmentos esperados para cada um dos alelos após a digestão.

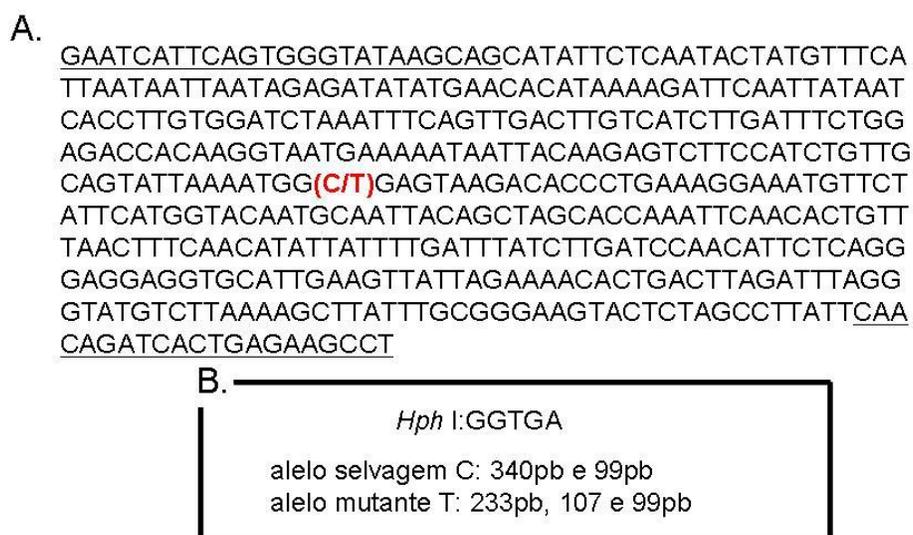


Figura 22. Detalhamento da análise da mutação 3849 + 10Kb C>T. Em A, sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado (em vermelho, os possíveis alelos) e em B, o sítio reconhecido pela endonuclease de restrição e os fragmentos esperados para cada alelo.

4. Caracterização fisiológica

A determinação da secreção de íons cloreto pela CFTR foi realizada através de medidas bioelétricas em micro-câmara de Ussing como previamente descrito por Mall e colaboradores (2004) (91). A micro-câmara foi montada e instalada no Laboratório de Eletrofisiologia do Núcleo de Medicina Experimental da UNICAMP.

O aparato é formado por duas metades ou por dois blocos feitos de material inerte (teflon), talhados de modo a formarem, quando juntos, uma estrutura que permite a introdução da amostra e que previne o vazamento das soluções

experimentais de uma metade para outra (Figura 23A). A montagem dos espécimes foi realizada com o auxílio de uma lupa em um disco convexo de área de $0,95\text{mm}^2$ (Figura 23B) que foi colocado entre as duas metades da câmara de modo a propiciar que a face luminal do tecido permanecesse sob perfusão contínua de soluções em uma das metades da câmara e a basolateral na outra. Esses procedimentos foram realizados pela Dra. Adriana Mendes Vinagre, bióloga responsável pelo Laboratório de Eletrofisiologia do Núcleo de Medicina/UNICAMP, ou pela aluna de doutorado Marisa Sousa do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

A micro-câmara de Ussing situa-se dentro de uma gaiola de Faraday para que as medidas não sofram influência do meio externo, como mostra a figura 23C. Nessa estrutura são montados os reservatórios que contém as soluções como o tampão e os diversos compostos utilizados no procedimento, bem como todo seu sistema de transporte até as duas metades da câmara.

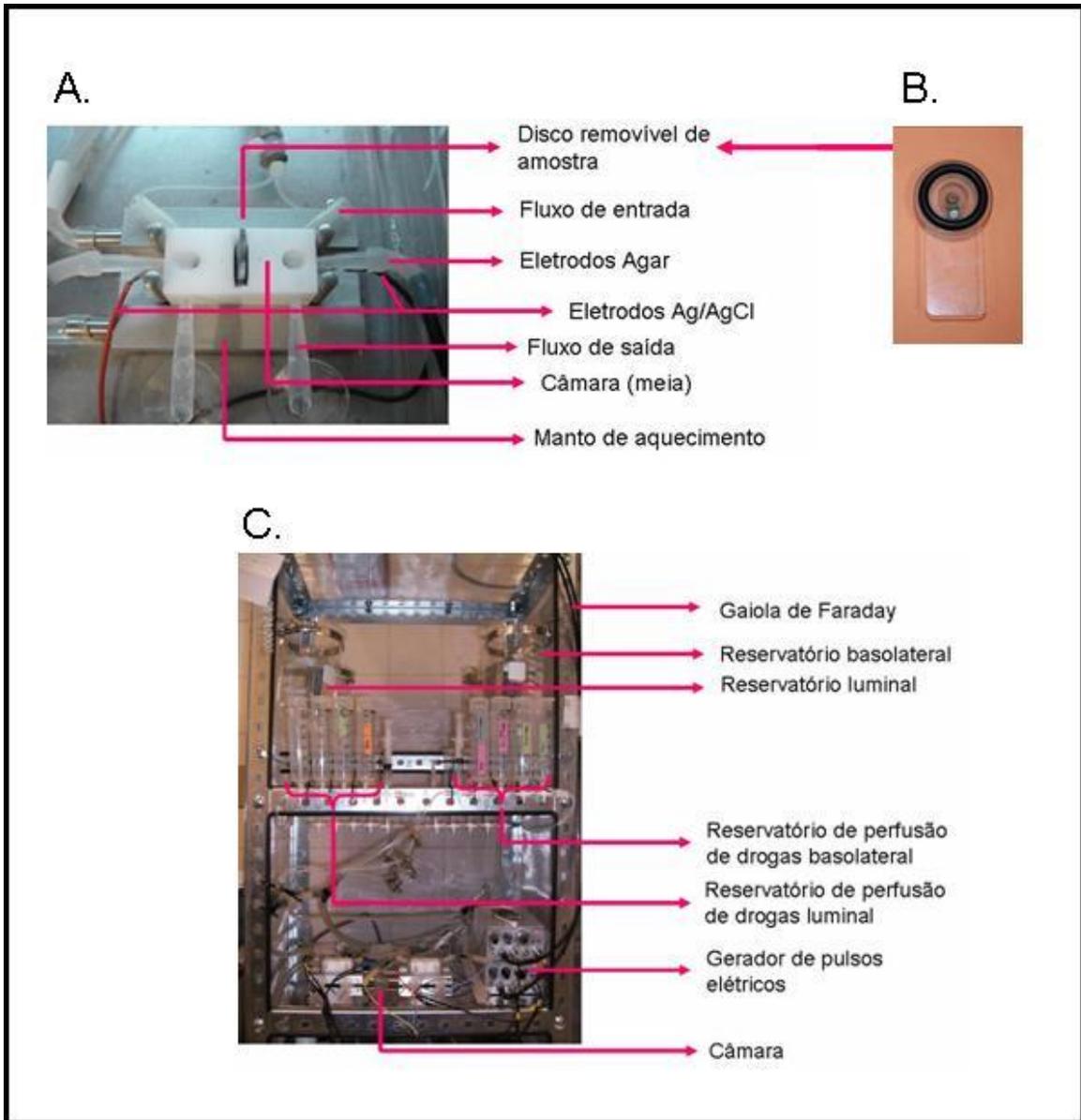


Figura 23. Detalhamento da micro-câmara de Ussing. A. Cada metade da câmara contém um sistema de entrada e saída de solução, eletrodos que aplicam os pulsos e eletrodos que captam a resistência. B. Detalhe do disco onde as amostras são montadas. C. Estrutura onde o experimento é realizado. As soluções situadas nos reservatórios indicados pelas setas são levadas às duas metades da câmara por tubos de PVC, cuja vazão é controlada por válvulas que podem ser abertas ou fechadas à escolha. Em cada reservatório é colocada uma solução de uma determinada droga (ver texto) (Figura cedida por Marisa Sousa, Laboratório de Genética do Departamento de Química e Bioquímica-Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

Conforme descrito por Mall e colaboradores (2004) (91), a proteína CFTR age como um canal de cloro dependente de AMP cíclico na membrana luminal do

epitélio respiratório e colônico. Estudos prévios mostram que agonistas mediados por AMP cíclicos e dependentes de cálcio agem cooperativamente na secreção de cloro. A secreção de cloro estimulada por íons de cálcio se deve principalmente a atividade da CFTR. O Ca^{+2} estimula também o CaCC (canal de cloro dependente de cálcio) e canais de K^+ na membrana basolateral, que levam ao aumento da força de secreção de íons cloreto mediada pela CFTR. A figura 24 mostra um modelo celular do epitélio colônico.

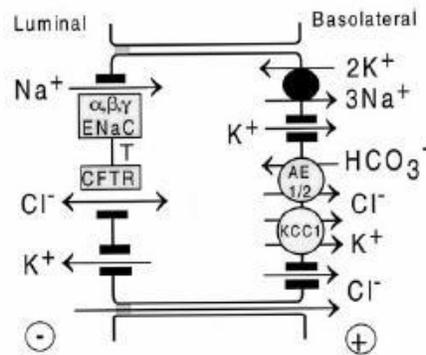


Figura 24. Modelo celular de absorção de sódio e cloro em cólon de mamíferos. O sódio é retirado da face luminal do epitélio pelo canal epitelial de sódio (ENaC). As ATPases- Na^+K^+ basolaterais propiciam a absorção luminal de Na^+ , através da diminuição intracelular desse íon. Canais de K^+ basolaterais ativados por Ca^{+2} e AMPc são responsáveis pela reciclagem do K^+ . A absorção de Na^+ gera assim uma voltagem transepitelial lúmen negativa que facilita a absorção de Cl^- através da CFTR luminal. A CFTR no epitélio dessas células de absorção controla a inibição do ENaC e diminui a absorção de NaCl, retirado de Kunzelmann e Mall, 2001 (92).

Tecidos epiteliais transportam íons e, portanto, geram uma voltagem transepitelial. Essa voltagem tem sido denominada como "potencial de transporte ativo". Um pré-requisito para a geração do potencial de transporte é a distribuição assimétrica dos canais de íons nas membranas apical e basolateral das células epiteliais polarizadas (Figura 24). O movimento de cargas positivas da região apical (luminal) para a região basolateral gera uma medida que é igual à diferença da voltagem entre as duas membranas (93). O epitélio apresenta duas características

que o distingue de todos os outros tecidos: polaridade e estancamento (do inglês, *tightness*). A polaridade é gerada pela distribuição assimétrica de proteínas, tanto nas membranas apicais como nas membranas basolaterais. Um conjunto de proteínas chamadas "*tight junctions*" separa as membranas entre as duas células. A formação e a permeabilidade das "*tight junctions*" determina a resistência e a integridade do tecido que são parâmetros fundamentais para esse experimento (93). Após a montagem do experimento e verificação da resistência, pulsos curtos de corrente (0,5 μA - duração de 1s, período de 5s) são injetados nas câmaras, através de um gerador de pulsos (Figura 25). A corrente passa através do tecido e cria um desvio de voltagem breve, deixando a célula intacta na maior parte do tempo durante a medição. O sinal medido é uma corrente "traduzida" em uma voltagem pelo gerador de pulsos (Power Lab AD Instruments®), que é continuamente monitorado e gravado por um sistema de aquisição de dados (LabChart 7). Sob essas condições, quando R_{te} (resistência transepitelial) e V_{te} (voltagem transepitelial) são conhecidas, a I_{sc} (Corrente de Curto-Circuito) pode ser calculada a partir da Lei de Ohm: $I_{sc} = V_{te} / R_{te}$.

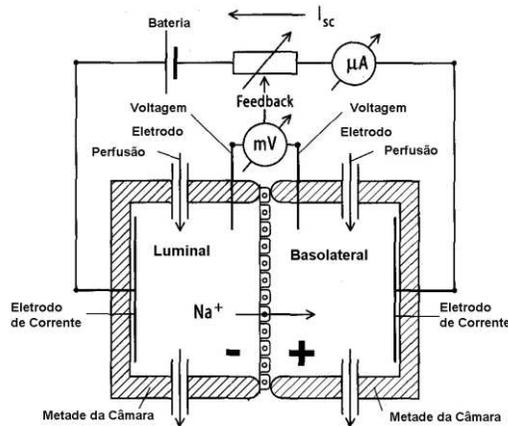


Figura 25. Circuito elétrico na micro-câmara de Ussing em condições de circuito-aberto, retirado de Kunzelmann e Mall, 2001 (92).

Os passos experimentais foram então realizados conforme descrito por Mall e colaboradores (2004) (91), na seguinte ordem:

1. amilorida ($20\mu\text{Mol/L}$) na porção luminal para inibição do canal de sódio (ENaC). O transporte de íons de sódio sensível a amilorida é aumentado em espécimes sem CFTR;
2. carbacol ($100\mu\text{Mol/L}$) na porção basolateral para ativação da secreção colinérgica (ativada por íons de cálcio). O carbacol tipicamente induz resposta de secreção de cloro, aumentando a concentração de íons negativos no lúmen, ao contrário do que acontece na ausência de CFTR, onde ocorre a resposta inversa, causada pela secreção de íons potássio (lúmen positivo);
3. indometacina ($10\mu\text{Mol/L}$) na porção basolateral, para a inibição da secreção de cloro dependente de AMP cíclico. Em tecidos normais, a secreção basal

de cloro é largamente inibida por indometacina. Tecidos sem CFTR perdem a secreção basal de cloro;

4. carbacol (100 μ Mol/L) na porção basolateral para ativação da secreção colinérgica na presença da indometacina. Depois do pré-tratamento com indometacina, ou seja, da inibição da CFTR, o carbacol induz secreção de íons potássio em tecidos com ou sem CFTR (lúmen positivo);
5. IBMX/forskolin (100/2 μ Mol/L) na porção basolateral para ativação da secreção dependente de AMP cíclico mediado por CFTR que induz resposta secretória de cloro em tecidos normais, mas não em tecidos onde a CFTR está ausente;
6. carbacol (100 μ Mol/L) na porção basolateral para ativação da secreção colinérgica na presença da IBMX/forskolin. A coativação colinérgica aumenta a secreção de cloro em tecidos normais e induz uma resposta inversa de secreção de íons potássio em tecidos sem CFTR.

Obs: Todas as drogas são diluídas em solução tampão (145mM NaCl; 0,4mM K₂HPO₄; 1,6mM K₂HPO₄; 5mM D-glicose; 1mM MgCl₂; 1,3mM Glucanato de cálcio; pH=7,4) e antes de perfundir o tecido tem temperatura estabilizada por banho-maria a 37°C.

Os efeitos esperados para as etapas descritas acima estão esquematizadas na Figura 26.

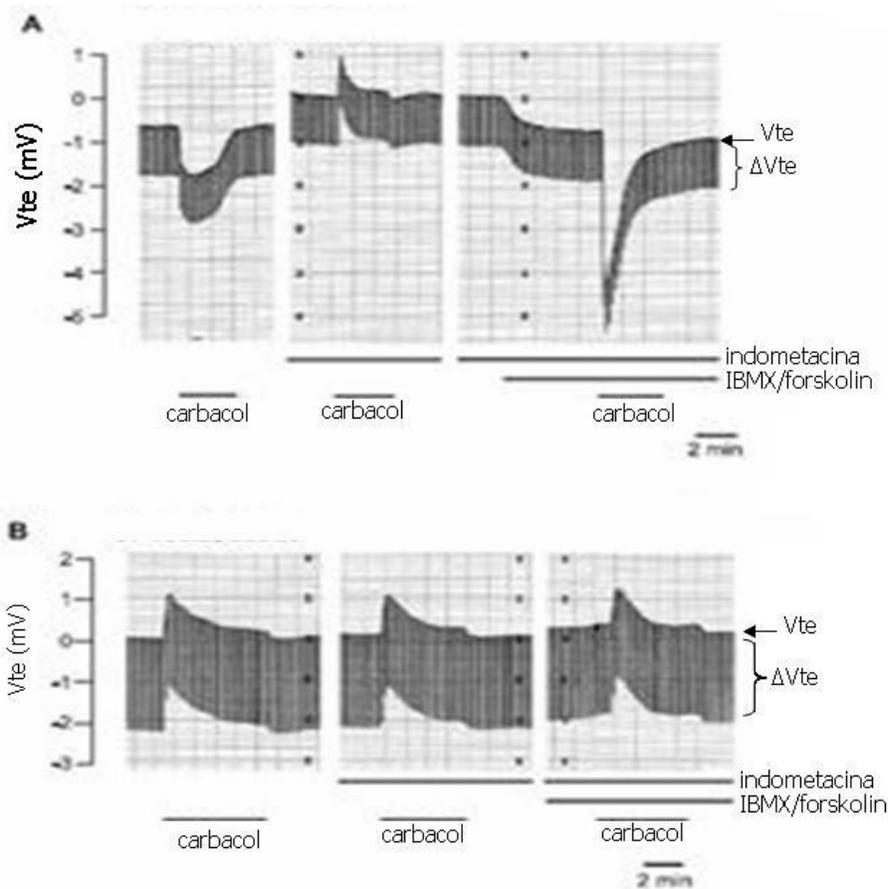


Figura 26. Análise da biópsia retal em micro-câmara de Ussing. A figura mostra o comportamento da voltagem transepitelial (Vte) frente à ação das diferentes drogas. Em A, biópsia retal de um indivíduo controle e em B, biópsia retal de paciente com FC (91).

5. Análise dos dados

A análise dos dados, quando apropriado, foi realizada com o programa BioEstat, versão 5.2. Foram escolhidos para análise estatística testes não-paramétricos, que são testes apropriados em análises onde o tamanho amostral é reduzido e os valores não apresentam distribuição normal, como o caso dos dados utilizados nessa pesquisa. Foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, também conhecido como teste U, para a comparação de uma variável entre duas amostras independentes. Foi realizado o teste não-paramétrico de correlação de

Spearman para a determinação da correlação entre duas variáveis quando os dados eram ordenativos. Para a comparação de uma variável entre três amostras independentes foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, também conhecido como teste H. Se a estatística H resultou em valor de p significativo, o método de Dunn foi o escolhido para a comparação das médias, por ser mais conservador e considerar o tamanho amostral. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

1. Caracterização clínica

Participaram da pesquisa trinta pacientes com hipótese diagnóstica de fibrose cística e com idade superior a 18 anos. A proporção de homens e mulheres foi de 17:13, ou seja, 56,7 % de homens e 43,3% de mulheres. A média de idade dos participantes foi de 29,5 anos com desvio padrão de 8,40. Nenhum dos pacientes possuía consanguinidade na família.

O quadro 7 apresenta os dados de idade ao diagnóstico e concentrações de íons de cloro e sódio no suor.

Quadro 7. Idade ao diagnóstico e resultados de teste de sódio e cloro no suor dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.

Código	Idade ao Diagnóstico	Data do exame	Concentração de Na ⁺ (mEq/L)	Concentração de Cl ⁻ (mEq/L)*	Data do exame	Concentração de Na ⁺ (mEq/L)	Concentração de Cl ⁻ (mEq/L)
113/00	7 anos	29/02/2000	82,9	107,4	02/02/2011	116,0	104,5
694/00	1 anos e 3 meses	20/10/1993	63,7	90,7	09/03/1994	61,5	93,1
236/01	7 anos e 11 meses	20/10/1994	53,5	66,2	22/12/1994	68,1	70,3
411/01	19 anos e 2 meses	31/01/2001	94	88	15/05/2001	101	123,8
535/01	2 anos	21/03/2001	111	181	23/05/2004	114	105
582/01	10 anos	25/09/1981	71,5	76	26/09/1983	75,8	85,8
589/01	4 anos	1991	76,00	87,00	1991	73	91
644/01	1 ano e 10 meses	06/1991	55	55	08/1991	77,4	82,2
775/01	13 anos	10/07/1989	67,1	72,8	24/02/2011	40,89	42,53
813/01	1 ano e 3 meses	25/03/1993	82,2	148,1	17/12/1992	85,3	153,8
973/01	4 anos	12/1994	76	110	02/1995	76,3	115
715/02	8 anos	06/09/1984	101,27	139,17	16/04/1998	57	55,3
719/02	2 anos	27/11/1985	66,2	116,5	-	-	-
198/03	21 anos	06/04/03	102,0	136,2	02/04/03	93,1	112,3

Código	Idade ao Diagnóstico	Data do exame	Concentração de Na ⁺ (mEq/L)	Concentração de Cl ⁻ (mEq/L)*	Data do exame	Concentração de Na ⁺ (mEq/L)	Concentração de Cl ⁻ (mEq/L)
2459/04	1 ano	08/11/2007	156,2	154,3	02/02/2011	115,3	139,5
501/05	1 ano e 4 meses	04/1990	90,7	165,1	04/1998	74,3	157
790/05	29 anos	20/05/2003	65,3	69,3	10/12/2004	51	68,9
1322/05	2 anos e 6 meses	-	-	-	-	-	-
404/06	12 anos	20/07/1994	23,2	15	29/03/2011	29,3	30,1
856/06	15 anos	18/05/2006	60,9	74,1	30/05/2006	69,5	83,6
456/07	18 anos e 6 meses	01/03/2007	74,6	72,8	21/06/2007	91	97
484/07	16 anos	-	-	26	-	-	15
173/08	5 anos	15/05/1995	88,6	143,7	-	-	-
175/08	12 anos	08/08/1995	81,6	112,9	13/09/1995	74,4	102,3
331/08	18 anos	22/07/2008	62,1	60,8	16/11/2008	32,4	29,8
260/09	31 anos	21/11/2007	91,3	95,3	11/12/2007	88,4	98,70
554/09	28 anos	15/02/2004	92,8	125,2	25/02/2004	79,7	120,30
616/10	49 anos	27/11/2009	-	137,5	01/03/2011	105,5	130,3
841/10	35 anos	30/09/2010	72,3	73,8	21.12.2010	69,8	70,7
68/11	8 anos	15/03/1988	99,3	157,9	08/1995	112,6	151,8

*Valores de referência para secreção de cloreto no teste do suor: <40 mEq/L= secreção normal; entre 40 e 60mEq/L=limítrofe e >60mEq/L=indicativo de FC.

-=Dados não disponíveis no prontuário médico do paciente.

O Quadro 8 resume os dados clínicos gerais dos pacientes. Com relação ao *status* nutricional, 16,7% dos pacientes apresentam magreza, 66,7% apresentam peso saudável, 13,3% apresentam sobrepeso e 3,3% apresentam obesidade. Na cultura de rotina diagnóstica do escarro 64% dos pacientes apresentaram colonização crônica por *Staphylococcus aureus*, 56% por *Pseudomonas aeruginosa*, 12% por *Burkholderia cepacia*, 8% por *Aspergillus sp*, 4% por

Stenotrophomonas maltophilia, 4% por *Achromobacter denitrificans*. Um paciente (4%) apresentou flora normal. As frequências encontradas para as comorbidades associadas à FC foram: 57,1% de insuficiência pancreática, 34,5% de intolerância a glicose, 33,3% de perda óssea, 27,6% de polipose nasal e 3,4% de íleo meconial.

Quadro 8. Características clínicas gerais dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.

Código	IMC* (data)	Insuficiência pancreática	Diabetes/intolerância a glicose	Íleo Meconial	Polipose nasal	Colonização crônica por	Osteoporose/ Osteopenia	Espermograma	História familiar
113/00	21,16 (07/12/2010)	Sim	Sim	Não	Não	Sa	Não	Não fez	Não tem
694/00	21,82 (10/02/2011)	Sim	Não	Não	Sim	Sa	Não	Não fez	Irmã com FC
236/01	17,92 (18/07/2006)	Sim	Não	Não	Não	Sa	Não	Oligospermia	Irmão gêmeo faleceu 1 mês após nascimento
411/01	27,92 (19/09/2010)	Não	Sim	Não	Sim	Sa, Pa	Não	-	Tia faleceu 1 semana após o nascimento
535/01	24,89 (14/06/2011)	Sim	Não	Não	Não	Sm, Asp	Não	Não fez	Não tem
582/01	34,75 (03/05/2011)	Não	Não	Não	Não	-	Não	Não fez	Não tem
589/01	24,22 (28/04/2011)	Não	Não	Não	Não	-	Não	Não fez	Não tem
644/01	15,82 (28/04/2011)	Não	-	-	-	Sa	Sim	-	Não tem
775/01	21,91 (26/01/2011)	Não	Não	Não	Sim	Sa, Pa	Sim	Normal	Não tem
813/01	23,40 (07/10/2010)	Não	Não	Não	Sim	Pa, Bc	Não	-	Não tem
973/01	19,44 (26/10/2010)	Sim	Não	Sim	Sim	Sa, Pa	Sim	-	Não tem
715/02	20,27 (15/09/2010)	Sim	Sim	Não	Não	Sa, Pa	Não	Não fez	Não tem
719/02	22,49 (29/09/2010)	Sim	Sim	Não	Não	Bc	Sim	azoospermia	Não tem
198/03	16,61 (18/08/2009)	Sim	Sim	Não	Não	Pa	Sim	azoospermia	Não tem

Código	IMC* (data)	Insuficiência pancreática	Diabetes/intolerância a glicose	Íleo Meconial	Polipose nasal	Colonização crônica por	Osteoporse/ Osteopenia	Espermograma	História familiar
2459/04	23,98 (02/02/2011)	Sim	Sim	Não	Não	Sa, Pa, Bc	Sim	Não fez	Duas irmãs faleceram com suspeita de FC
501/05	21,23 (28/03/2011)	Sim	Sim	Não	Sim	Pa, Ad	Não	-	Irmão faleceu aos 4 meses
790/05	14,29 (26/01/2011)	Não	Não	Não	Não	Sa	Sim	-	Não tem
1322/05	18,67 (10/05/2011)	Sim	Sim	Não	Não	Sa, Pa	Não	-	Não tem
404/06	23,31 (27/05/2011)	Sim	Sim	Não	Não	Sa	Não	Normal	Não tem
856/06	20,59 (26/03/2011)	Sim	Não	Não	Não	-	Não	Não fez	Não tem
456/07	20,45 (11/04/2011)	Não	Não	Não	Não	As, Asp	Não	-	Não tem
484/07	15,85 (28/11/2008)	Não	Não	Não	Não	Pa	Não	Normal	Não tem
173/08	21,17 (13/04/2010)	Sim	Sim	Não	Não	Sa	Sim	Não fez	Irmã morreu. Apresentava vômitos e cianose
175/08	19,72 (20/05/2011)	Não	Não	Não	Não	Pa	Não	-	Não tem
331/08	25,88 (11/11/2008)	Não	Não	Não	Não	normal	Não	Normal	Não tem
260/09	20,09 (04/02/2011)	Sim	Não	Não	Não	Sa, Pa	Não	-	Não tem
554/09	26,12 (18/08/2009)	Sim	Não	Não	Sim	Sa, Pa	Sim	-	Não tem
616/10	26,22 (11/03/2011)	Não	Não	Não	Sim	-	Não	Sim	Filha com fibrose cística (fertilização in vitro)
841/10	18,63 (19/01/2011)	-	Não	Não	Não	-	Sim	-	Não tem
68/11	24,92 (01/02/2011)	-	Não	Não	Não	Sa, Pa	Não	-	Irmão com FC

Onde Sa= *Staphylococcus aureus*, Pa= *Pseudomonas aeruginosa*, Sm= *Stenotrophomonas maltophilia*, Ad= *Achromobacter denitrificans*, Asp= *Aspergillus sp* e Bc= *Burkholderia cepacia*.

*Valores de referência para IMC segundo a OMS: <18,5=magreza; 18,6 a 24,9=peso saudável; 25,0 a 29,9= sobrepeso e acima de 30= obesidade.

-=Dados não disponíveis no prontuário médico do paciente.

A prova de espirometria foi realizada em sua maioria no último ano, no Laboratório de Função Pulmonar (LAFIP) no Centro de Investigação em Pediatria

(CIPED) da UNICAMP, e seguiu as normas da ATS-ERS. Com relação ao quadro pulmonar foi avaliado volume expiratório forçado (VEF_1), capacidade vital forçada (CVF), a razão entre VEF_1 /CVF (Índice de Tiffeneau) e fluxo expiratório forçado entre 25-75%. A saturação de O_2 transcutânea (SpO_2) também foi avaliada (Quadro 9) bem como os dados da última tomografia computadorizada (CT) realizada pelo paciente (Quadro 11).

Houve comprometimento obstrutivo do pulmão em 75% dos pacientes avaliados pelo Índice de Tiffeneau. Em 66,7% dos pacientes o FEV_1 foi menor que 70% e em 79,3% dos pacientes o $FEF_{25-75\%}$ foi menor que 70%, valores que indicam comprometimento pulmonar global e das pequenas vias aéreas, respectivamente. O teste de SpO_2 mostrou que 64% dos pacientes tinham suprimento adequado de O_2 , 24% apresentavam hipoxemia leve e 12%, hipoxemia moderada.

Quadro 9. Avaliação das manifestações pulmonares dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.

Código	VEF_1 (%)	CVF (%)	Índice de Tiffeneau (VEF_1 /CVF)	FEF _{25-75%} (%)	Data da coleta de dados	SpO_2 (data)
113/00	77	74	78	54	07/12/2010	98% (23/03/2011)
694/00	116	108	89	132	10/02/2011	98% (27/04/2010)
236/01	84	70	94	84	18/07/2006	99% (03/07/2007)
411/01	40	52	77	23	13/09/2010	98% (08/08/2009)
535/01	33	53	62	15	13/06/2011	90% (14/06/2011)
582/01	67	74	78	59	03/05/2011	98% (06/01/2009)
589/01	71	87	71	50	28/04/2011	-

Código	VEF ₁ (%)	CVF (%)	Índice de Tiffeneau (VEF ₁ /CVF)	FEF _{25-75%} (%)	Data da coleta de dados	SpO ₂ (data)
644/01	74	70	96	77	28/04/2011	96% (11/02/2003)
775/01	21	40	44	8	26/01/2011	94% (09/06/2009)
813/01	37	54	62	17	07/10/2010	90% (22/12/2009)
973/01	44	63	63	18	26/10/2010	92% (02/09/2008)
715/02	66	90	62	37	15/09/2010	94% (03/03/2009)
719/02	72	87	73	47	29/09/2010	97% (30/07/2008)
198/03	47	67	62	25	18/08/2009	90% (10/03/2009)
2459/04	41	48	74	29	02/02/2011	97% (21/08/2007)
501/05	45	61	74	19	18/02/2011	98% (07/07/2009)
790/05	21	27	76	14	26/01/2011	98% (07/07/2009)
1322/05	50	64	71	26	17/08/2010	96% (10/05/2011)
404/06	101	102	-	89	14/09/2007	95% (13/01/2009)
856/06	83	101	69	56	26/03/2011	-
456/07	67	77	79	49	11/04/2011	95% (13/10/2009)
484/07	21	22	-	-	28/11/2008	-
173/08	58	89	59	24	13/04/2010	97% (10/08/2010)
175/08	59	68	79	50	20/05/2011	99% (21/12/2010)
331/08	87	103	84	60	28/01/2009	94% (09/03/2004)
260/09	61	62	102	73	18/03/2011	98% (26/08/2010)
554/09	47	61	72	31	18/08/2009	97% (24/05/2011)
616/10	90	82	91	123	11/03/2011	-
841/10	60	63	87	60	19/01/2011	-
68/11	59	86	66	30	01/02/2011	98% (06/10/2010)

Com relação aos parâmetros de espirometria avaliados (FEV₁, CVF, Índice de Tiffeneau e FEF_{25-75%}), quanto menor o valor, pior a função pulmonar. Índice de Tiffeneau abaixo de 80% indicam obstrução e abaixo de 60%, restrição. Valores de SpO₂ acima de 95% são considerados com suprimento adequado de oxigênio, de 91 a 95% com hipoxemia leve, 85 a 90% com hipoxemia moderada, e menor que 85% como hipoxemia grave.

-=Dados não disponíveis no prontuário médico do paciente.

Com relação à gravidade clínica avaliada pelo escore de Shwachman-Kulczycki, 33,3% dos pacientes apresentaram estado geral de bom a excelente, 55,6% apresentaram gravidade moderada a média e 11,1% apresentaram estado geral grave (Quadro 10). Os valores de gravidade pulmonar dos pacientes, avaliada pelo escore de Bhalla, estão demonstrados no quadro 10. Todos esses valores foram obtidos no último ano.

Quadro 10. Escores de gravidade dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC.

Código	Bhalla	Shwachman-Kulczycki
113/00	10	65
694/00	3	95
236/01	4	75
411/01	10	80
535/01	8	50
582/01	-	-
589/01	-	100
644/01	-	55
775/01	15	75
813/01	11	50
973/01	9	55
715/02	-	65
719/02	17	50
198/03	23	40
2459/04	12	45
501/05	10	60
790/05	10	40
1322/05	13	60
404/06	0	95
856/06	5	80
456/07	8	70
484/07	-	-
173/08	8	55
175/08	11	55
331/08	-	-
260/09	-	40
554/09	11	55
616/10	-	95
841/10	-	60

Os valores de referência de gravidade do escore de Shwachman-Kulczycki são: de 86 a 100 excelente, de 71 a 85 bom, de 56 a 70 médio, de 41 a 55 moderado e menos de 40 grave. Com relação aos escores de Bhalla, quanto maior é o valor, maior a gravidade.

--Dados não disponíveis no prontuário médico do paciente.

As características clínicas relevantes obtidas por exames complementares estão ilustradas no quadro 11.

Quadro 11. Características clínicas adicionais dos pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC, como resultado do CT de tórax.

Código	Característica clínicas adicionais
113/00	Esteatose hepática/pancreatopatia/Bronquiectasias bilateral de impaction brônquica e bronquiolar. Opacidade nodular nos lobos inferiores.
694/00	Pancreatopatia crônica.
236/01	Balanço de gordura sempre alterado/epilepsia com crises parciais complexas.
411/01	Bronquiectasias difusas com impaction mucóide, predominante nos lobos superiores, atelectasia do lobo superior direito/esteatose hepática.
775/01	Hepatite C/ bronquiolite obliterante, bronquiectasias, bolhas subpleurais.
973/01	Broncopatia difusa, bronquiectasias císticas e varicosas nos lobos superiores.
715/02	Esteatose hepática.
719/02	Espessamento do interstício peribroncovascular, bronquiectasias, bronquioloectasias, nódulos centro-lobulares.
198/03	Esteatose hepática /prolapso retal.
501/05	Bronquiectasias.
790/05	Bronquiectasias.
1322/05	Extensas bronquiectasias e atelectasias cilíndricas e algumas de configuração cística, que comprometem difusamente ambos os pulmões.
404/06	Diabetes mellitus/ esteatorréia acentuada.
856/06	Dermatomiosite/diarreia crônica/bronquiopatia e bronquiolopatia.
456/07	Discretas bronquiectasias.
484/07	Bronquiectasias.
173/08	Bronquiectasias e nódulos centrolobulares e árvore brotamento.
175/08	Bronquiectasias.
331/08	Antecedentes constantes de broncoespasmos.
260/09	Bronquiectasias.
554/09	Sinais de bronquiectasias.
616/10	A hipótese diagnóstica foi levantada a partir do diagnóstico da filha que foi concebida por fertilização <i>in vitro</i> .

Conforme exposto no capítulo de introdução, duas características marcantes na gravidade da FC são: o *status* nutricional influenciado entre outros parâmetros

pela suficiência pancreática e o *status* pulmonar. A fim de avaliar a relação dessas apresentações clínicas com os outros marcadores de gravidade os pacientes foram agrupados conforme ilustrado nas tabelas 3 e 4 e os resultados das análises estão ilustrados nas figuras 27 e 28. Não existiu diferença significativa entre os marcadores de gravidade avaliados e a insuficiência pancreática (Tabela 3). Apesar da diferença entre as médias de idade ao diagnóstico entre pacientes com suficiência e insuficiência pancreática, a distribuição de valores foi ampla de forma que não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3, Figura 27).

Tabela 3. Relação entre o acometimento pancreático e marcadores de gravidade.

	Acometimento do pâncreas	Média	Desvio padrão	Z (U)*	Valor de p
Idade do diagnóstico (anos)	SP	15,96	13,15	1,594	0,111
	IP	9,31	9,67		
Idade em 31/08/2011	SP	30,25	9,31	0,708	0,479
	IP	27,13	6,80		
VEF ₁ (%)	SP	54,58	25,56	0,731	0,465
	IP	64,06	23,30		
FEF _{25-75%} (%)	SP	48,18	33,29	0,023	0,981
	IP	47,44	32,60		

Onde SP= suficiência pancreática e IP= insuficiência pancreática.

* Mann-Whitney.

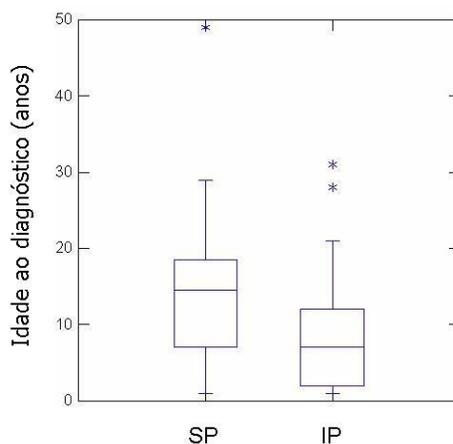


Figura 27. Relação entre insuficiência pancreática e idade ao diagnóstico. Onde SP= suficiência pancreática e IP=insuficiência pancreática.

A associação entre a colonização crônica por *P. aeruginosa* e a perda de função pulmonar foi estatisticamente significativa (Tabela 4, Figura 28), evidenciados pela diminuição de valores de VEF₁ e CVF em pacientes cronicamente colonizados por esse patógeno.

Tabela 4. Relação entre função pulmonar e colonização por *P. aeruginosa*.

Função pulmonar	Colonização crônica por <i>P. aeruginosa</i>	Média	DP	Z (U)*	Valor de <i>p</i>
VEF ₁ (%)	Sim	71,8	27,4	2,628	0,009
	Não	45,7	15,2		
CVF (%)	Sim	78,2	23,8	2,409	0,016
	Não	60,1	19,3		
Tiffeneau	Sim	79,0	12,4	1,674	0,094
	Não	68,6	15,0		
FEF _{25-75%} (%)	Sim	58,6	35,5	1,941	0,052
	Não	31,8	18,5		

Onde negrito=estatisticamente significativo.

* Mann-Whitney.

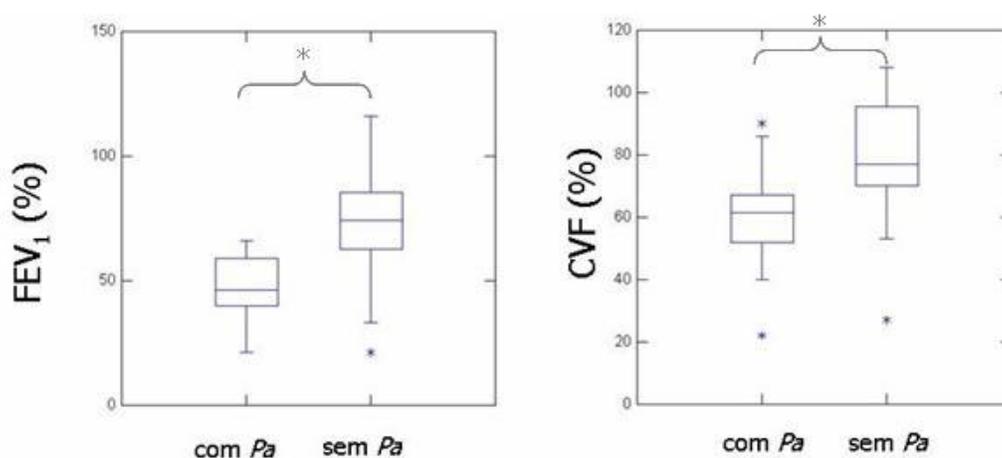


Figura 28. Relação entre a colonização crônica por *P. aeruginosa* (*Pa*) e a função pulmonar. A análise de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os grupos indicados por chave, onde *= $p \leq 0,05$

2. Caracterização molecular

A) Pesquisa direta da mutação F508del

Após a análise molecular para a identificação de F508del (Figura 29), a

proporção de pacientes homozigotos e de heterozigotos para a mutação F508del nessa amostra foi de 16,67% (5/30) e 26,67% (8/30) respectivamente. Em 56,66% (17/30) da amostra a mutação F508del não foi encontrada. Portanto, nessa amostra, a frequência do alelo F508del foi de 0,30.

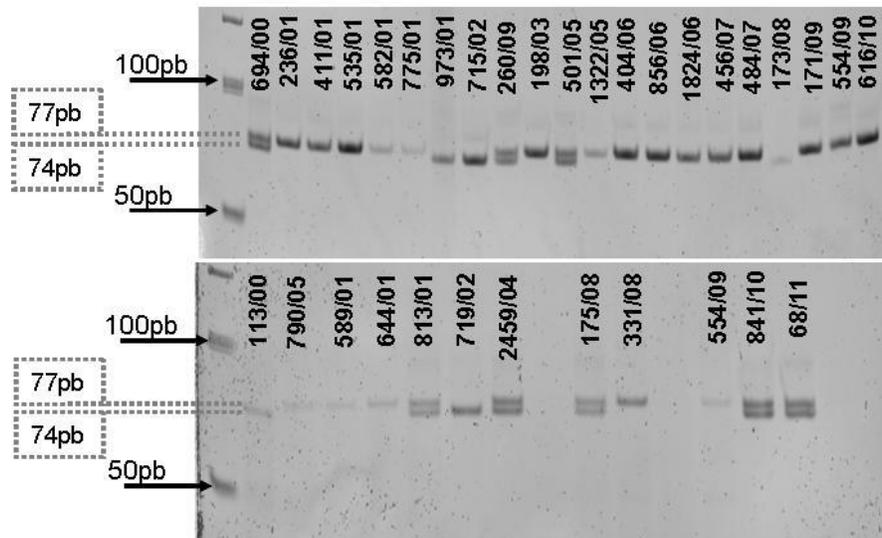


Figura 29. Gel não desnaturante de poliacrilamida a 12% demonstrando os resultados obtidos na análise de F508del, onde M=marcador de peso molecular de 50pb.

B) Amplificação dos fragmentos contendo as regiões codificantes do gene *CFTR* e as junções intron/exon

As reações de amplificação pela PCR foram padronizadas com a finalidade de se obter uma solução contendo concentração de aproximadamente 100ng/ μ L do fragmento de interesse. O resultado da padronização das reações de amplificação está ilustrado na figura 30.

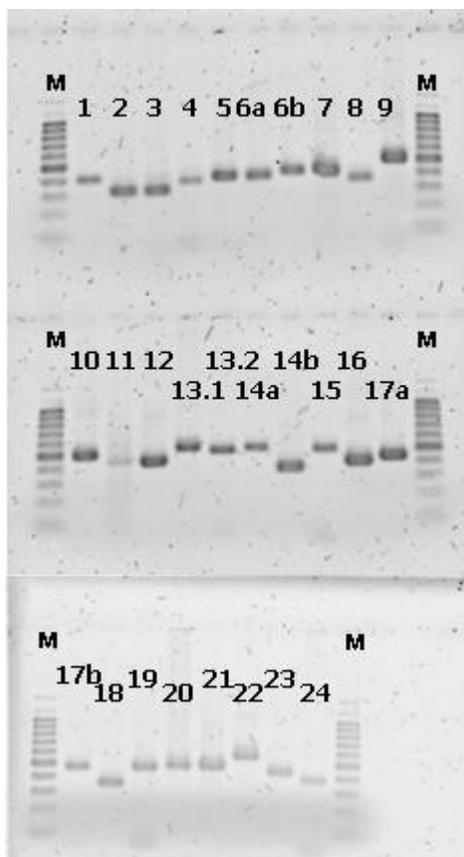


Figura 30. Gel de agarose a 1% ilustrando o resultado da amplificação dos fragmentos que contém todos os exons e junção exon/intron do gene *CFTR*, onde M=marcador de peso molecular de 100pb.

C) Cromatografia líquida desnaturante de alta resolução – DHPLC

Um total de 113 fragmentos foi analisado pela técnica de DHPLC, dos quais 16 apresentaram padrão de retenção alterado (Quadro 12). Esses fragmentos foram encaminhados para sequenciamento automático e os resultados estão descritos e explicados na sessão D1 desse capítulo. A figura 31 ilustra as alterações encontradas na análise em DHPLC.

Quadro 12. Resultados dos padrões de retenção obtidos pela técnica de DHPLC..

Código	nº de fragmentos avaliados	nº de fragmentos alterados	Fragmentos analisados por DHPLC, com destaque para aqueles com padrão de retenção alterados
694/00	8	0	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
411/01	6	3	1, 3, 4, 11*, 16*, 18*, 20
535/01	13	3	3, 4, 5, 6b*, 7, 11*, 12, 13.1*, 16, 18, 19, 20, 22
644/01	8	0	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
775/01	8	0	1, 3, 4, 7, 11, 16, 18, 20
198/03	7	1	1, 3, 4, 7, 11*, 18, 20
501/05	13	3	1*, 3, 4, 5, 6b*, 7, 11, 12, 13.1, 16*, 18, 19, 22
790/05	11	1	1*, 2, 3, 4, 5, 6b, 7, 11, 13.1, 19, 20
404/06	15	1	1, 2, 3, 4, 5, 6b*, 7, 11, 12, 13.1, 14 ^a , 16, 18, 19, 20
856/06	14	2	1*, 2, 3, 4, 5, 6b*, 7, 11, 12, 13.1, 16, 19, 20, 22
456/07	10	2	1, 3, 4, 5, 7, 11*, 13.1, 16, 18, 20*
TOTAL	113	16	

Onde * significa padrão de retenção alterado.

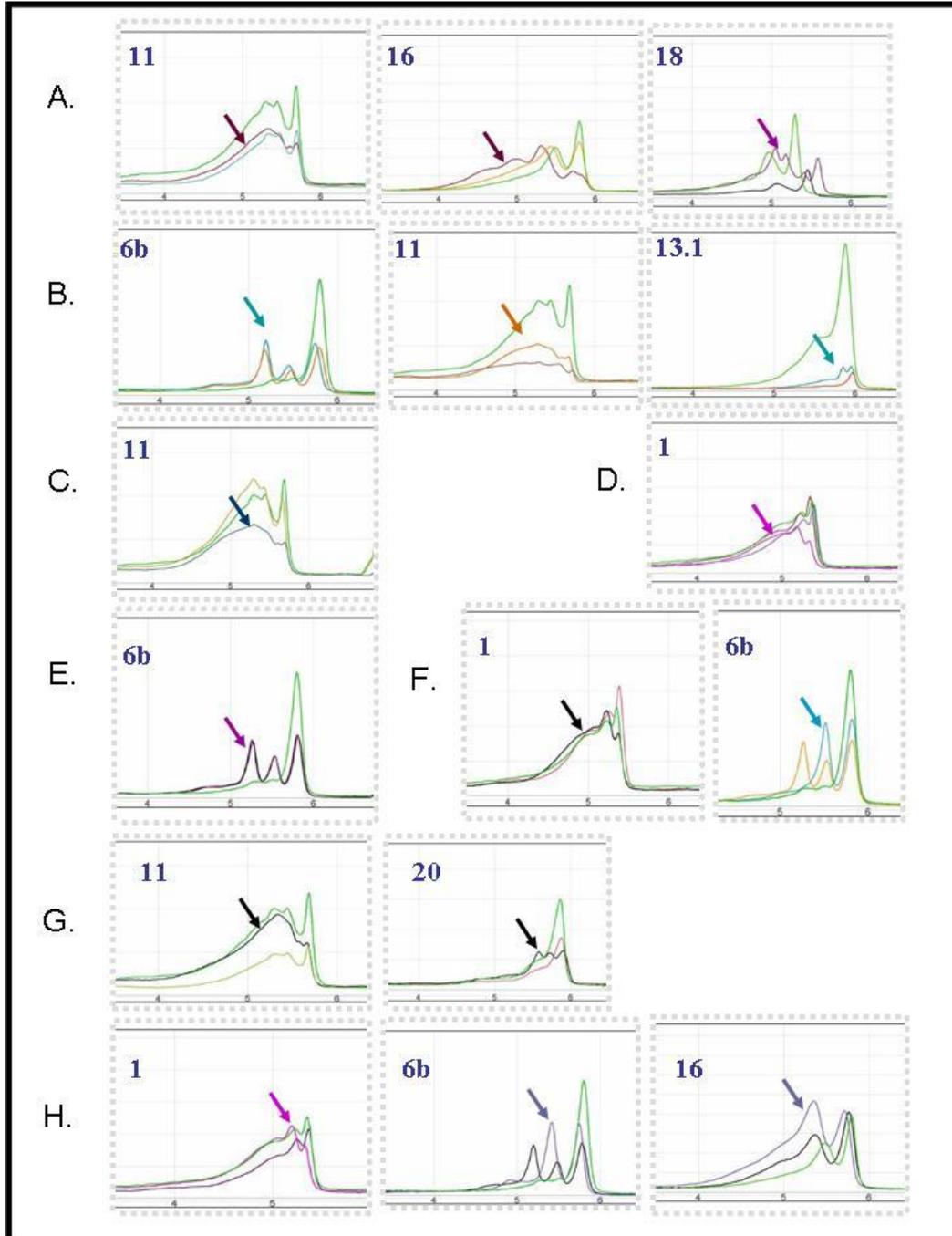


Figura 31. Resultados de pacientes que apresentaram padrão de retenção alterado. A seta evidencia o padrão apresentado pelo paciente e as curvas em verde, o padrão esperado para um indivíduo sem alteração. Em A, paciente 411/01 (P. D. R.): padrão de retenção dos fragmentos que contém os exons 11, 16 e 18. Em B, paciente 535/01 (V. A. M.): padrão de retenção dos fragmentos que contém os exons 6b, 11 e 13.1. Em C, paciente 198/03 (M. A. M.): padrão de retenção do fragmento que contém o exon 11. Em D, paciente 790/05 (A. A. P.): padrão de retenção do fragmento que contém o exon 1. Em E, paciente 404/06 (C. S.): padrão de retenção do fragmento que contém o exon 6b. Em F, paciente 856/06 (M. R. I.): padrão de retenção dos

fragmentos que contém os exons 1 e 6b. Em G, paciente 456/07 (K. K. S. B. M.): padrão de retenção dos fragmentos que contém os exons 11 e 20. Em H, paciente 501/05 (J. V. R. A.): padrão de retenção dos fragmentos que contém os exons 1, 6b e 16.

Analisando os diferentes padrões de retenção de um mesmo fragmento é possível notar que alguns tipos de alteração se repetem. A figura 31B ilustra o mesmo tipo de alteração que a figura 31E para o fragmento que contém o exon 6b. O mesmo acontece quando se compara os padrões alterados do fragmento que contém o exon 1 (Figura 31D e 31F).

D) Sequenciamento automático de DNA

1. Amostras com padrão de retenção alterado no DHPLC

A paciente 411/01 (P.D.R.) teve os fragmentos que continham os exons 11, 16 e 18 analisados por sequenciamento automático de DNA e foi encontrada alteração molecular somente no exon 11 (Figura 32). Essa alteração já foi descrita como uma troca da base G pela T na posição 1756 do transcrito, levando a formação de um códon de parada prematuro no códon 542 (p.G542X). Essa mesma alteração foi encontrada nos pacientes que mostraram o mesmo padrão de retenção: 535/01 (V.A.M), 198/03 (M.A.M.), 456/07 (K.K.S.B.M.).

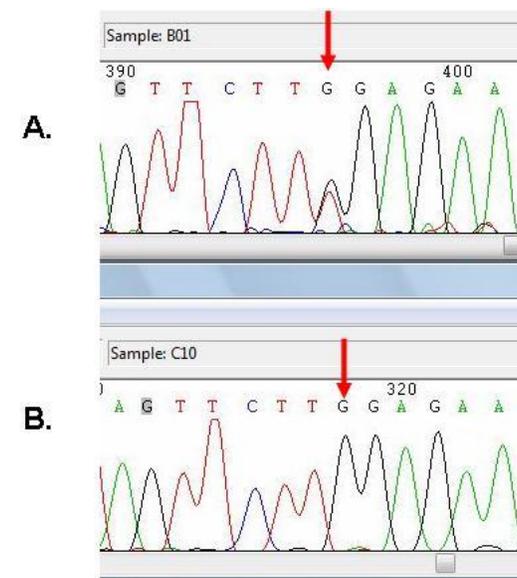


Figura 32. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 11 da paciente 411/01 (P.D.R.), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado. Em A, eletroferograma do paciente e em B, eletroferograma de um controle sem alteração.

O paciente 535/01 (V.A.M.) teve os fragmentos que continham os exons 6b, 11 e 13.1 analisados por sequenciamento automático e foi encontrada alteração molecular nos três fragmentos analisados (Figura 33). A alteração no fragmento que contém o exon 11, como mencionado anteriormente, foi identificada como a p.G542X. A alteração do fragmento que contém o exon 13 foi descrita como uma deleção de uma base A na posição 2184 do transcrito e pela troca da base A pela G na posição 2183 do transcrito, levando a alteração do tipo frameshift (c.2183AA>G). A alteração do fragmento que contém o exon 6b foi identificada como um polimorfismo de repetição em *tandem* de TTGA no intron 6a. Essa mesma alteração [c.744-31TTGA(5_7)] foi encontrada em heterozigose no paciente 404/06 (C.S.), o qual mostrou o mesmo padrão de retenção, e também na amostra 856/06 (M.R.I.), que apresentou um padrão de retenção alterado

diferente.

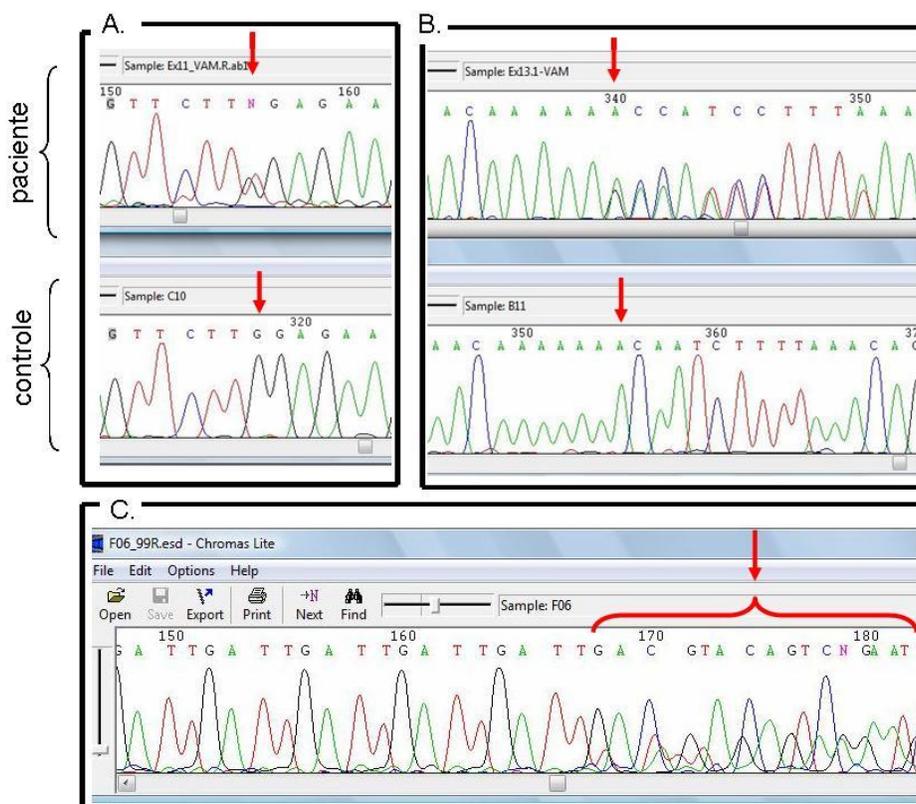


Figura 33. Sequenciamento do fragmento que contém os exons 6b, 11 e 13 do paciente 535/01 (V.A.M.), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado. Em A, fragmento que contém o exon 11; em B, fragmento que contém o exon 13 e em C, fragmento que contém o exon 6b.

Os pacientes 501/05, 790/05 e 856/06 apresentaram um mesmo polimorfismo, uma troca de uma base G por C na posição 125 do transcrito (c.125G>C), ou seja, na região 5' UTR. A figura 34 ilustra a alteração.

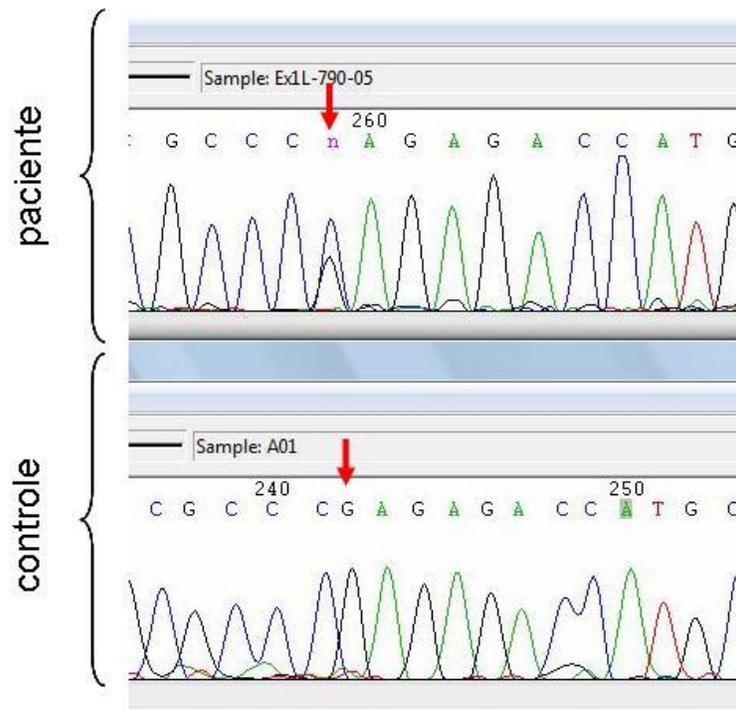


Figura 34. Sequenciamento do fragmento que contém do exon 1 da paciente 790/05 (A.A.P.), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado.

A paciente 456/07 (K. K. S. B. M.) teve os fragmentos que continham os exons 11 e 20 analisados por sequenciamento automático e foi encontrada alteração molecular nos dois fragmentos analisados (Figura 35). A alteração no fragmento que contém o exon 11, como falado anteriormente, foi identificada como a p.G542X. A alteração do fragmento que contém o exon 20 foi identificada como uma alteração neutra de troca da base A pela G na posição 4002 do transcrito (c.4002A>G, p.P1290P).

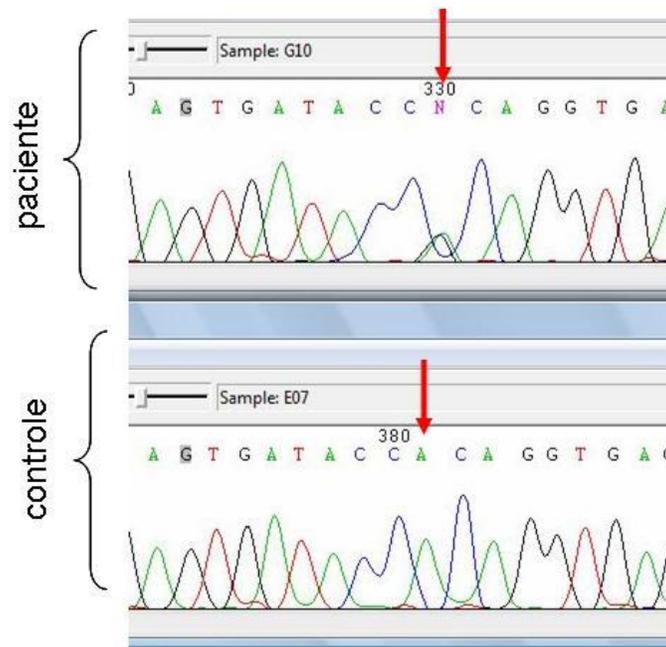


Figura 35. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 20 da paciente 456/07 (K.K.S.B.M.), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado. Em A, eletroferograma do paciente e em B, eletroferograma de um controle sem alteração.

O fragmento que contém o exon 6b apresentou dois diferentes padrões de retenção alterados (Figura 31E e 31H). O padrão ilustrado na figura 31E, como já descrito no texto, se relaciona à alteração de repetição em tandem de TTGA em heterozigose no intron 6a. O padrão da 31H se relaciona à alteração c.1001+11C>T em heterozigose, no intron 6b (Figura 36).

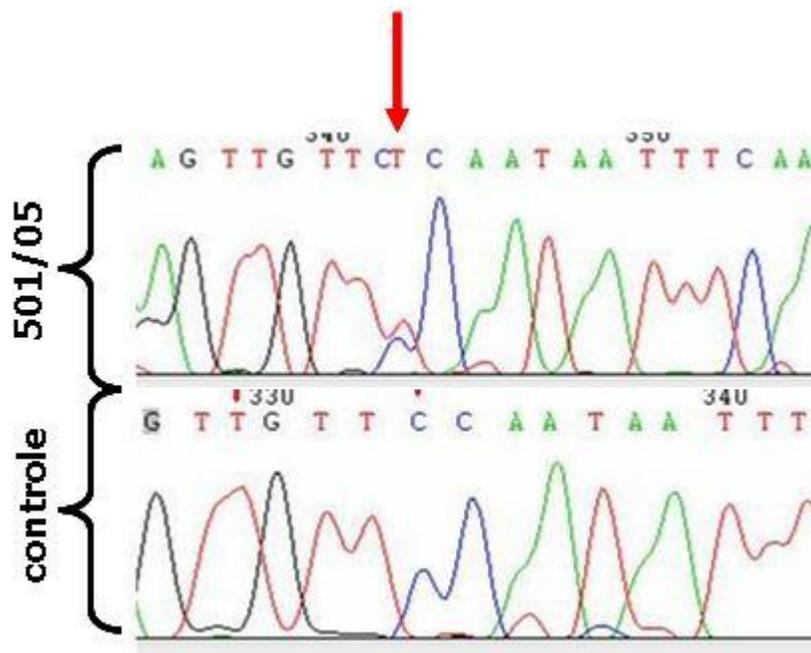


Figura 36. Sequenciamento do fragmento que contém o exon 6b da paciente 501/05 (J.V.R.A), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado.

Em resumo, pela técnica de DHPLC+sequenciamento dos fragmentos com padrão alterado, foram encontradas 13 alterações moleculares, sendo cinco delas sabidamente associadas à FC. É importante ressaltar que em três dos 16 fragmentos que mostraram padrão de retenção alterado, a alteração molecular não foi detectada por sequenciamento.

2. Diretamente das reações de amplificação

Foi realizado o sequenciamento completo das regiões codificantes gene *CFTR* em 24 dos 30 pacientes que participaram da pesquisa, não sendo necessário a realização desse tipo de análise em pacientes que tiveram seu diagnóstico molecular efetuado por pesquisa direta de F508del (113/00, 973/01, 715/02, 719/02, 173/08) ou por análise dos fragmentos alterados como o caso do paciente

535/01.

Os resultados se encontram reunidos no quadro 13 e ilustrados na figura 37. Foi observado um total de 13 alterações diferentes, todas elas associadas à fibrose cística.

Quadro 13. Resultados de sequenciamento dos pacientes participantes da pesquisa.

Código	Alelo 1 cDNA, proteína (localização)	Alelo 2 cDNA, proteína (localização)
694/00	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)	-
411/01	c.1132C>T, p.R334W (ex7)	c.1756G>T, p.G542X (ex11)
813/01	c.386G>A, p.G85E (ex3)	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)
198/03	c. 745C>T, p.P205S (ex6a)	c.1756G>T, p.G542X (ex11)
2459/04	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)	c. 4041C>G, p. N1303K (ex21)
501/05	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)	c.1789 C>T, p. R553X (ex11)
1322/05	c.1814C>A, p. A561E (ex12)	c.1814C>A, p. A561E (ex12)
456/07	c.1756G>T, p.G542X (ex11)	c.1985T>C, p. I618T (ex13)
175/08	c. 745C>T, p.P205S (ex6a)	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)
260/09	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)	c. 3272-26A>G (in17a)
554/09	c.3120+1G>A (in16)	-
616/10	c. 3978G>A, p.W1282X (ex20)	c. 4428insGA, p.S1435GfsX14 (ex24)
841/10	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)	c. 3586G>C, p. D1152H (ex18)
68/11	c.1132C>T, p.R334W (ex7)	c.1652_1655delCTT, p.F508del (ex10)

Em cDNA: A=adenina, T=timina, C=citosina e G= guanina

Na proteína: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, E=ácido glutâmico, F=fenilalanina, G= Glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, N=Asparagina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptofano, Y=tirosina e X=códon de terminação.

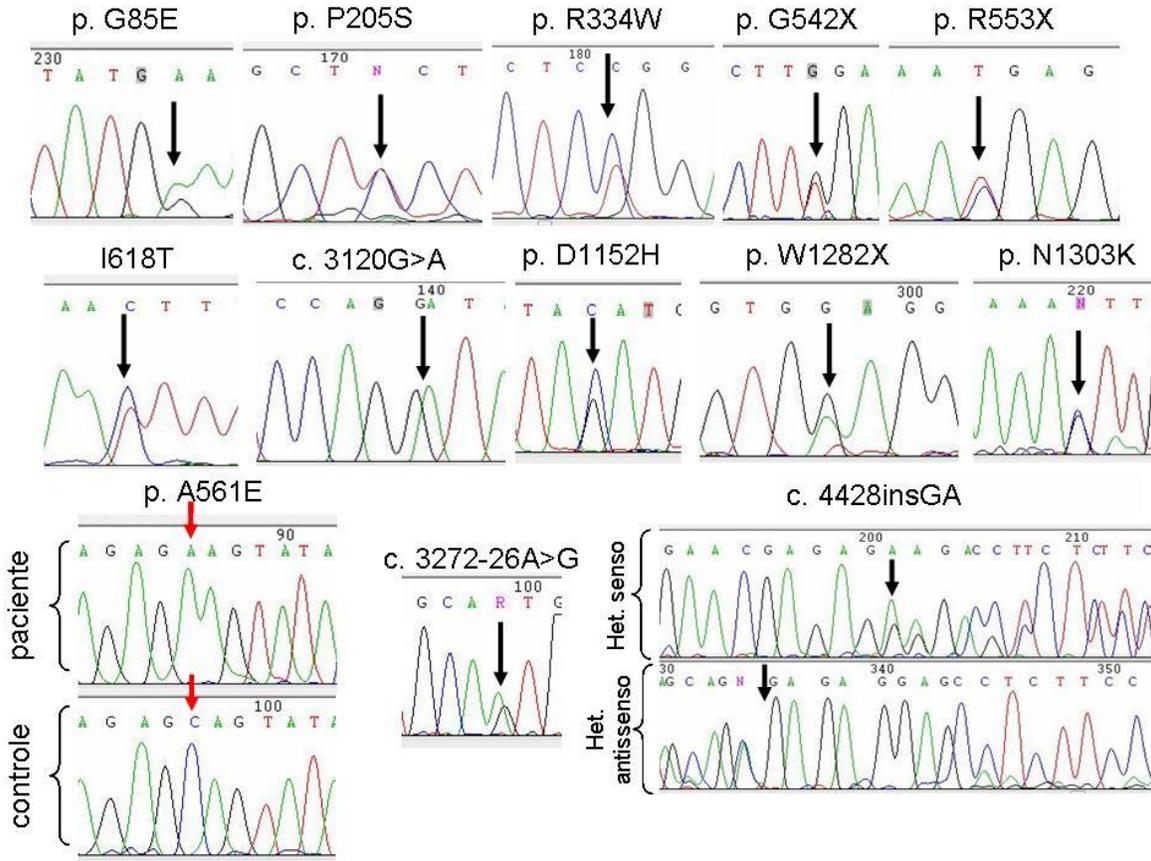


Figura 37. Eletroferogramas de todas as alterações encontradas na pesquisa que se associam com o quadro de fibrose cística. As alterações em heterozigose foram ilustradas sem o correspondente alelo selvagem e o local da mutação está evidenciado pela seta preta. A alteração em homozigose foi ilustrada juntamente com um controle selvagem, onde a seta vermelha evidencia a localização da alteração. Het=sequenciamento de um heterozigoto.

Para confirmar a presença da alteração 4428insGA, o produto da reação de amplificação do fragmento que contém o exon 24 do paciente 616/10 foi submetido à clonagem em células competentes de *Escherichia coli* (linhagem DH5a) utilizando-se o vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA). Clones independentes foram sequenciados a fim de obter seqüências dos dois alelos, normal e mutado, separadamente (Figura 38).

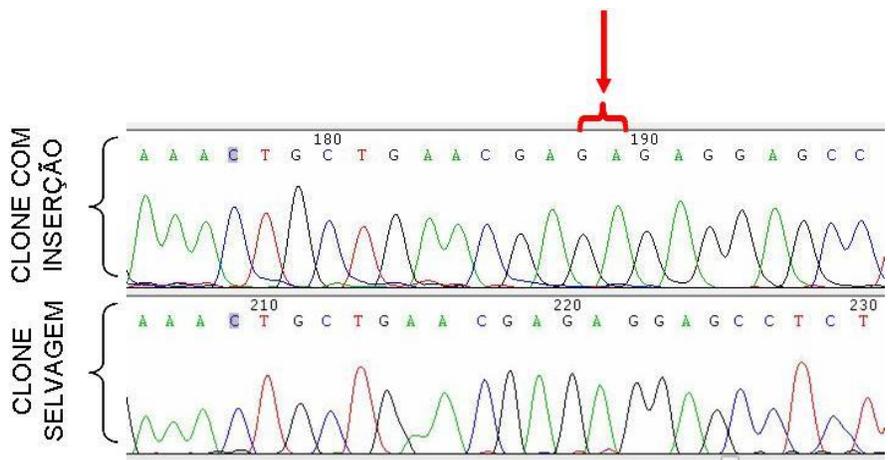


Figura 38. Sequenciamento do alelo selvagem e do alelo com a inserção 442insGA.

Foram encontradas na pesquisa, ainda pelo método de sequenciamento, algumas seqüências variantes já descritas como não relacionadas à clínica da FC (Figura 39 e Quadro 14).

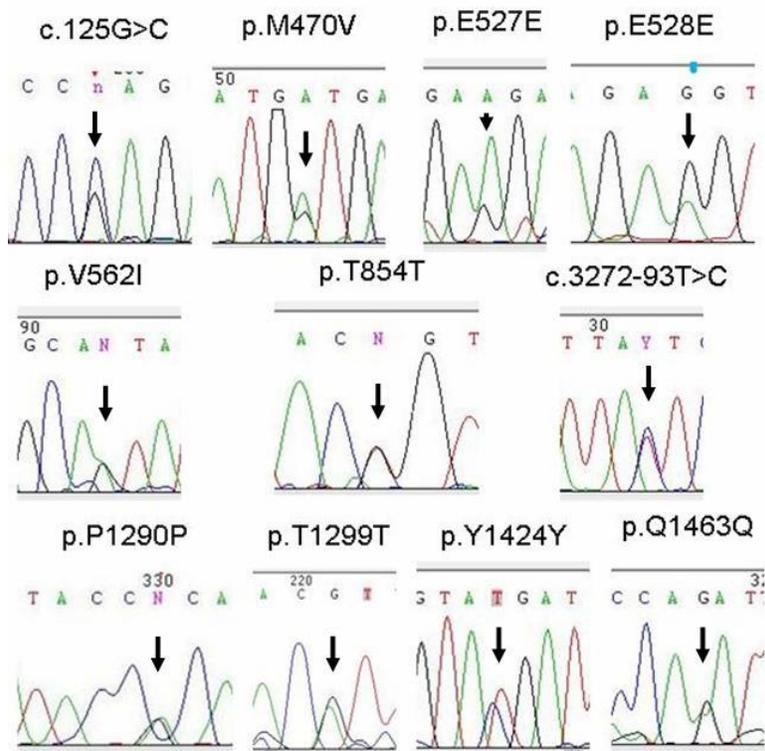


Figura 39. Eletroferogramas de todas as variações de seqüência encontradas no gene *CFTR* que não estão associadas à clínica de fibrose cística. Onde seta preta evidencia o local da mutação.

Quadro 14. Variações moleculares encontradas no gene *CFTR* e não associadas à FC.

Código	Iniciais	Variações na sequência
694/00	E. H. L.	p.E527E_HE, p.Q1463Q_HE
236/01	L.H.F.	p.E528E_HE, p.T854T_HE, c.3272-93T>C, p.Q1463Q_HE
582/01	R.A.S.	p.M470V_HE, p.T854T_HE
589/01	L. H. P.	p.M470V_HO, p.Y1424Y_HE
644/01	L.S.M.	p.M470V_HE
775/01	E.G.A.	p.V562I_HE, p.Q1463Q_HO
813/01	D. S. C.	p.M470V_HE
198/03	M.A.M.	p.M470V_HE
501/05	J.V.R.A.	c.125G>C_HE
790/05	A.A.P.	c.125G>C_HE, p.T854T_HE
1322/05	A.P.B.	p.M470V_HO
404/06	C.S.	p.M470V_HE
856/06	M.R.I.	c.125G>C_HE, 1001+9T>G, p.M470V_HE, p.T854T_HE
456/07	K.K.S.B.M.	p.P1290P_HE
484/07	O. R. F.	p.M470V_HO, p.T1299T_HE
331/08	J.S.V.	p.M470V_HE, p.T854T_HO, p.Q1463Q_HE
260/09	D.R.	p.M470V_HE
554/09	C.S.S.	p.T854T_HO, p.Q1463Q_HO
841/10	A. G.	p.M470V_HE
68/11	B. B. R. J.	p.T854T_HE

Onde HE= alteração encontrada em heterozigose e HO= alteração encontrada em homozigose.

Em cDNA: A=adenina, T=timina, C=citosina e G= guanina

Na proteína: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, E=ácido glutâmico, F=fenilalanina, G= Glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, N=Asparagina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptofano, Y=tirosina e X=códon de terminação.

A paciente 501/05 teve seu diagnóstico identificado por sequenciamento direto, uma vez que a mutação p. R553X não deu origem a padrão de retenção alterado na análise por DHPLC como mostra a figura 40B. Uma das possíveis explicações é que as temperaturas escolhidas para análise no DHPLC não propiciaram uma sensibilidade adequada para essa região. Note na figura 40A que a alteração se encontra na posição 191 do fragmento amplificado e que nessa posição a fração helicoidal está próxima de 1,0, como mostra o detalhe em 40C.

A.

```

CAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGATATATGATTACATTAGAAGGAAGATGTGCCTTTCA
AATTCAGATTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTGGTAATAGGACATCT
CCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAG
GTCAA(C/T)GAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGGTGAATAACTAATTATTGGTCTAGCAAGCAT
TTGCTGTAATGTCATTCATGTAATAAATTACAGACATTTCTCTATTGCTTTATATTCTGTT
TCTGGAATTGAAAAAATCCTGGGGTTTTATGGCTAGTGGGTTAAGAATCACATTTAAGAAC
TATAAATAATGGTATAGTATCCAGATTTGGTAGAGATTATGGTTACTCAGAATCTGTGC

```

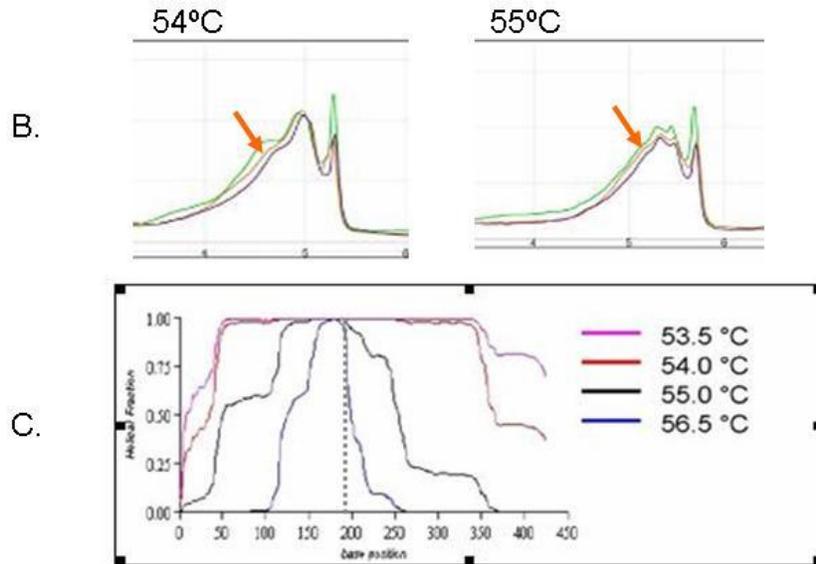


Figura 40. Detalhe da falha em detectar por DHPLC a alteração p. R553X encontrada por sequenciamento no exon 11 da paciente 501/05. Em A, seqüência do fragmento amplificado com detalhe para o local da alteração (em vermelho). Em B, análise por DHPLC nas duas temperaturas escolhidas para o fragmento que contém exon 11 (a seta evidencia o padrão apresentado pelo paciente e as curvas em verde, o padrão esperado para um indivíduo sem alteração). Em C, o gráfico de fração helicoidal por posição da base (linha pontilhada mostra o local da alteração).

E) MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

As amostras que apresentaram homozigose para alteração relacionada a fibrose cística foram submetidas a análise de perda de heterozigose por MLPA, já que os pacientes alegaram não apresentar consanguinidade na família. São eles 113/00, 973/01, 715/02, 719/02, 1322/05 e 173/08. Todos os pacientes avaliados não apresentaram deleções nas regiões das mutações.

A análise por MLPA foi realizada também nos pacientes onde a alteração

molecular em pelo menos um dos alelos não foi encontrada, a fim de determinar se essa alteração se devia a grandes deleções ou duplicações. São eles 694/00, 236/01, 582/01, 589/01, 644/01, 775/01, 790/05, 404/06, 856/06, 484/07, 331/08, 260/09, 554/09. Todos os pacientes avaliados não apresentaram deleções ou duplicações no gene *CFTR*. A figura 41 ilustra um resultado representativo para todos os pacientes analisados: todos os pacientes que não eram portadores da F508del apresentaram o padrão ilustrado na figura 41A; os portadores de um alelo com F508del apresentaram o padrão da figura 41B e os homocigotos para a alteração apresentaram o padrão ilustrado na figura 41C.

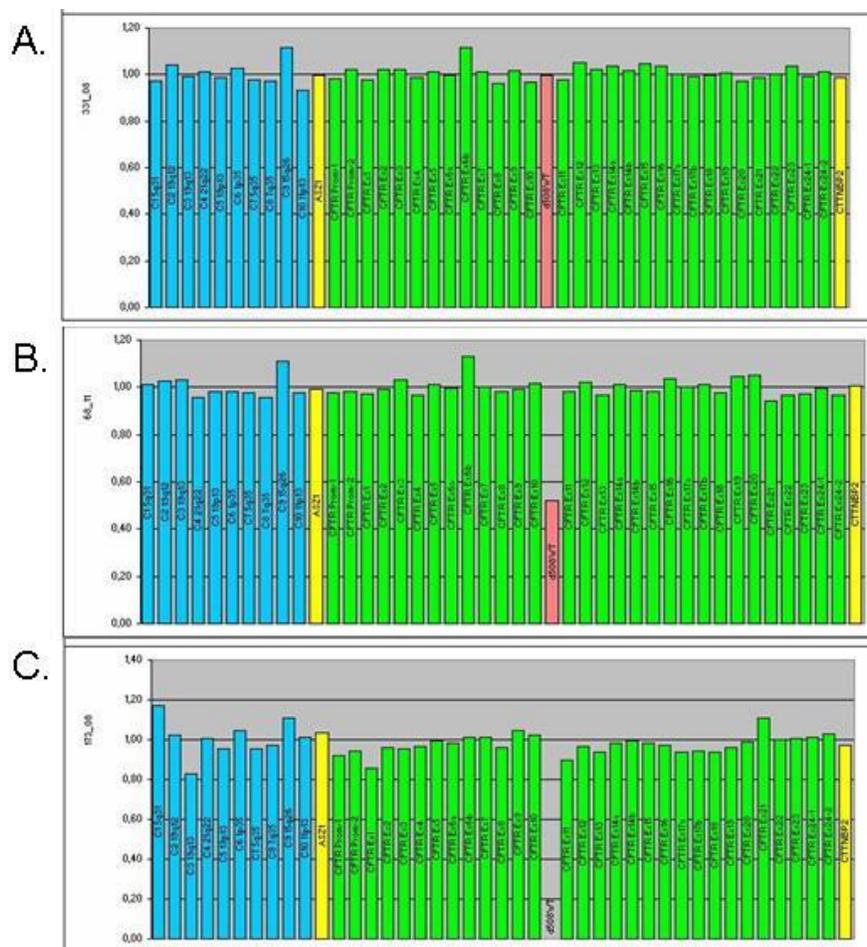


Figura 41. Resultados da análise por MLPA. A barra rosa identifica a alteração F508del.

F) Outras alterações

Após todas as análises propostas, doze pacientes não tiveram o diagnóstico molecular concluído: 694/00, 236/01, 582/01, 589/01, 644/01, 775/01, 790/05, 404/06, 856/06, 484/07, 331/08 e 554/09.

A mutação 1584-18672pb A>G foi encontrada em heterozigose em um (694/00) dos doze pacientes avaliados (Figura 42).

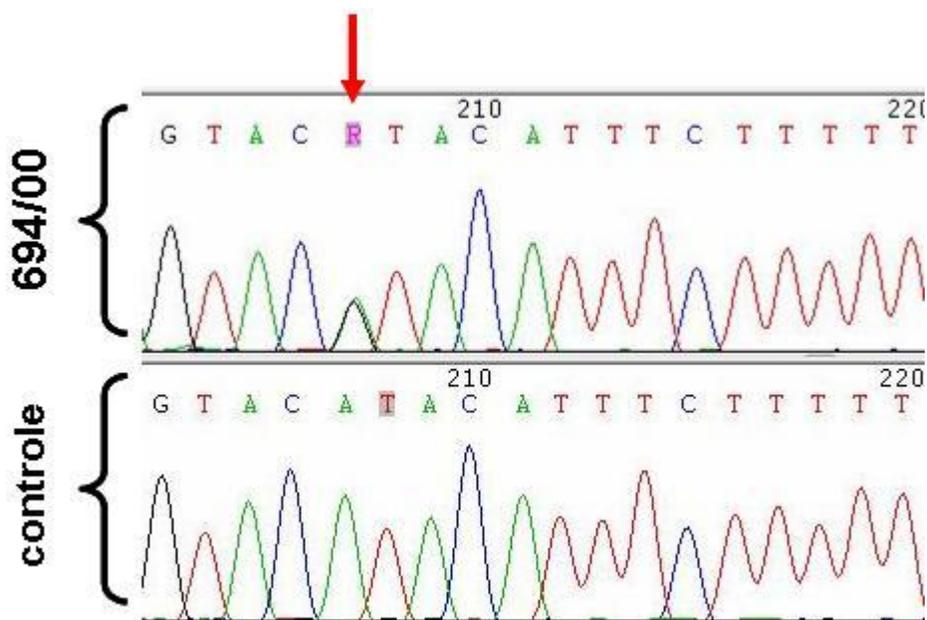


Figura 42. Sequenciamento do fragmento que contém a alteração 1584-18672pb A>G do paciente 694/00 (E. H. L.), onde a seta evidencia a localização da alteração no fragmento analisado. Os outros onze pacientes analisados apresentaram o padrão de eletroferograma ilustrado em *controle*.

Quanto a alteração 3849+10Kb C>T, todos os pacientes analisados mostraram o alelo selvagem (Figura 43).

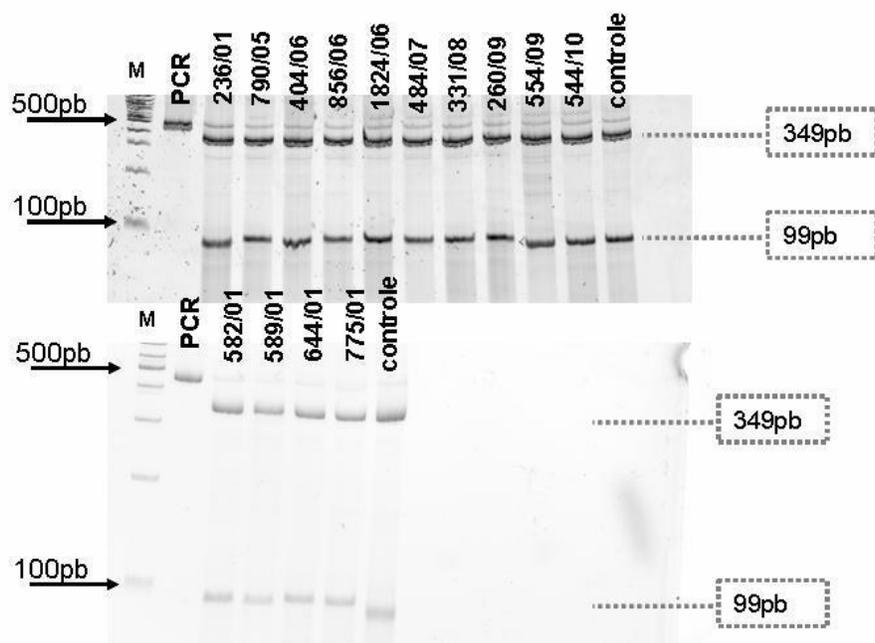


Figura 43. Gel não desnaturante de poliacrilamida a 12% demonstrando os resultados obtidos na análise de 3849+10KbC>T, onde M= marcador de 100pb.

O quadro 15 resume a caracterização molecular da amostra de 30 pacientes, bem como a classificação por tipo de mutação. Todas as alterações descritas em genótipo estão associadas a clínica de fibrose cística. Os polimorfismos não patogênicos encontrados não estão ilustrados nesse quadro.

Quadro 15. Caracterização molecular dos pacientes participantes da pesquisa.

Código	Iniciais	Genótipo de CFTR	Classe de mutações
113/00	L. F. A.	F508del/F508del	Classe II
694/00	E. H. L.	F508del/1584-18672pb A>G	Classe II e Classe V
236/01	L.H.F.	Não identificada	-
411/01	P.D.R.	R334W/G542X	Classe IV/Classe I
535/01	V.A.M.	G542X/2183AA>G	Classe I
582/01	R.A.S.	Não identificada	-
589/01	L. H. P.	Não identificada	-
644/01	L.S.M.	Não identificada	-
775/01	E.G.A.	Não identificada	-
813/01	D. S. C.	G85E/F508del	Classe II
973/01	A. O.	F508del/F508del	Classe II

Código	Iniciais	Genótipo de CFTR	Classe de mutações
715/02	R.F.L.	F508del/F508del	Classe II
719/02	T. V. P.	F508del/F508del	Classe II
198/03	M.A.M.	P205S/G542X	Classe IV e Classe I
2459/04	R.C.	F508del/N1303K	Classe II
501/05	J.V.R.A.	F508del/R553X	Classe II e Classe I
790/05	A.A.P.	Não identificada	-
1322/05	A.P.B.	A561E/A561E	Classe II
404/06	C.S.	Não identificada	-
856/06	M.R.I.	Não identificada	-
456/07	K.K.S.B.M.	G542X/I618T	Classe I e Classe II
484/07	O. R. F.	Não identificada	-
173/08	B. S. C.	F508del/F508del	Classe II
175/08	L.S.	P205S/F508del	Classe IV e Classe II
331/08	J.S.V.	Não identificada	-
260/09	D.R.	F508del/3272-26A>G	Classe II e Classe V
554/09	C.S.S.	3120+1G>A/ não identificada	Classe I
616/10	A. C. B.	W1282X/4428insGA	Classe I e Classe IV ou VI
841/10	A. G.	F508del/ D1152H	Classe II e Classe IV
68/11	B. B. R. J.	R334W/F508del	Classe IV e Classe II

Em cDNA: A=adenina, T=timina, C=citosina e G= guanina

Na proteína: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, E=ácido glutâmico, F=fenilalanina, G=Glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=lisina, L=leucina, M=metionina, N=Asparagina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptofano, Y=tirosina e X=códon de terminação.

3. Caracterização fisiológica

Os resultados obtidos através das medidas bioelétricas dos pacientes em micro-câmara de Ussing estão resumidos no quadro 16 e dos controles no quadro 17.

Quadro 16. Resultados qualitativos e quantitativos relativos à caracterização fisiológica dos pacientes participantes da pesquisa.

Código	Iniciais	Medidas eletrofisiológicas		
		Qualitativo (atividade do canal)	I _{sc} cAMP (µA/cm ²)	I _{sc} Ca ⁺² (µA/cm ²)
113/00	L. F. A.	Sem atividade	8,27	40,09
694/00	E. H. L.	Atividade residual	-31,12	-40,7
236/01	L.H.F.	Atividade normal	-46,56	-102,25

Código	Iniciais	Medidas eletrofisiológicas		
		Qualitativo (atividade do canal)	I _{sc} cAMP (μA/cm ²)	I _{sc} Ca ⁺² (μA/cm ²)
411/01	P.D.R.	Inconclusivo	-	-
535/01	V.A.M.	Sem atividade	5,17	23,47
582/01	R.A.S.	Atividade normal	-24,91	-117,72
589/01	L. H. P.	Atividade normal	-18,04	-99,11
644/01	L.S.M.	Atividade normal	-33,71	-190,95
775/01	E.G.A.	Atividade normal	-9,74	-17,16
813/01	D. S. C.	Atividade residual	-13,8	-12,14
973/01	A. O.	Sem atividade	6,02	15,09
715/02	R.F.L.	Sem atividade	9,02	14,22
719/02	T. V. P.	Sem atividade	16,08	39,93
198/03	M.A.M.	Atividade residual	-7,43	-19,91
2459/04	R.C.	Sem atividade	5,8	30,37
501/05	J.V.R.A.	Inconclusivo	-	-
790/05	A.A.P.	Atividade normal	-30,58	-138,61
1322/05	A.P.B.	Inconclusivo	-	-
404/06	C.S.	Atividade normal	-24,14	-155,09
856/06	M.R.I.	Atividade normal	-110,05	-347,21
456/07	K.K.S.B.M.	Atividade residual	-27,31	-34,55
484/07	O. R. F.	Atividade normal	-9,59	-38,97
173/08	B. S. C.	Sem atividade	5,68	30,3
175/08	L.S.	Atividade residual	-11,34	-10,34
331/08	J.S.V.	Atividade normal	-14,33	-66,11
260/09	D.R.	Atividade residual	-11,74	-9,13
554/09	C.S.S.	Atividade residual	-47,31	-76,34
616/10	A. C. B.	Atividade normal	-55,67	-83,55
841/10	A. G.	Atividade normal	-42,68	-97,69
68/11	B. B. R. J.	Atividade residual	-2,94	-9,59

Três pacientes (411/01, 501/05 e 1322/05) apresentaram exames inconclusivos, uma vez que a resistência dos espécimes de biópsia retal estava abaixo do valor recomendado para a confiabilidade do teste.

Quadro 17. Resultados qualitativos e quantitativos relativos à caracterização fisiológica dos controles.

Iniciais	Medidas eletrofisiológicas		
	Qualitativo (atividade do canal)	I_{sc} cAMP ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	I_{sc} Ca^{+2} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
C. M. A.	Normal	-22,57	-148,08
C. S. O.	Normal	-15,80	-112,39
M. A. D. P.	Normal	-29,64	-184,06
N. C. S.	Normal	-10,00	-119,79
B. H. B.	Normal	-26,22	-81,69
J. B.	Normal	-21,72	-287,19

A figura 44 ilustra os resultados qualitativos obtidos pela análise em micro-câmara de Ussing do indivíduo controle C.M.A. e dos pacientes 198/03 (M.A.M.) e 113/00 (L.F.A.). O paciente 198/03 possui a mutação P205S que resulta em atividade residual de CFTR e, portanto, ilustra o comportamento do tecido quando há atividade residual. O paciente 113/00 é homozigoto para a mutação F508del e, portanto, ilustra o padrão apresentado por todos os pacientes que não apresentam atividade de CFTR. A resposta que se espera após estímulo por AMPc é a abertura de CFTR com conseqüente aumento de íons cloreto na porção luminal e diminuição da V_{te} . Pacientes com atividade de CFTR, seja residual ou normal, apresentam esse comportamento (Figura 44A e B, primeira seta). Pacientes sem CFTR não apresentam resposta ao estímulo por AMPc (Figura 44C, primeira seta).

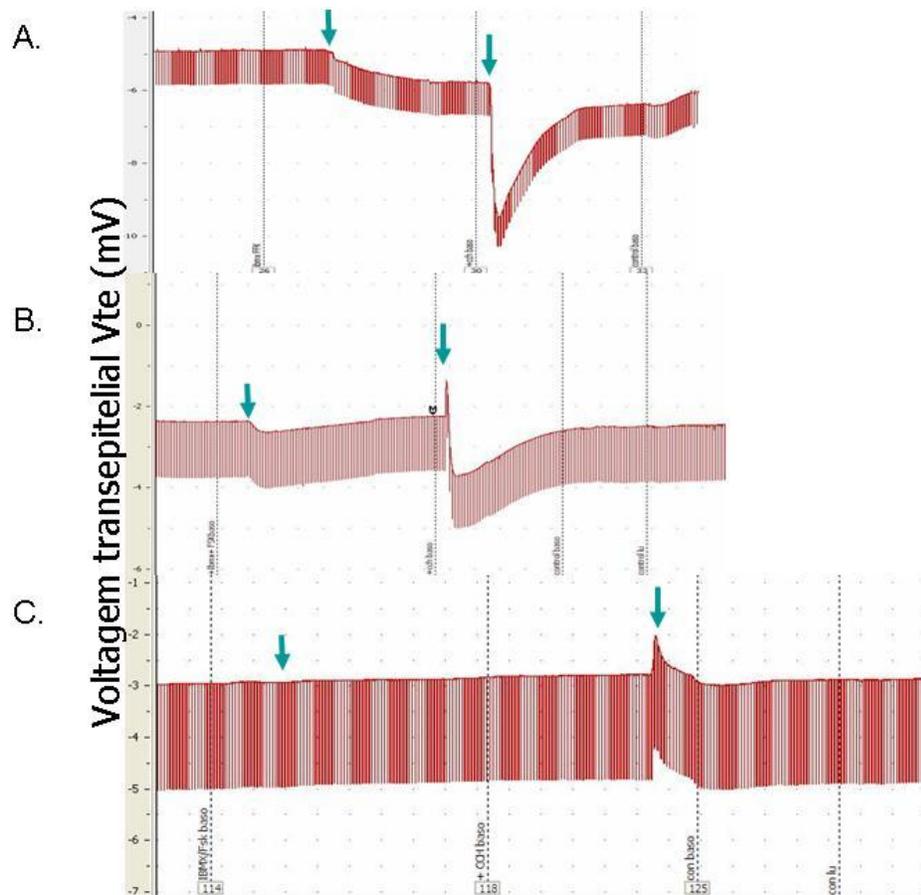


Figura 44. Padrões obtidos pela análise em micro-câmara de Ussing. Em A, controle C.M.A que não possui mutações em *CFTR*. Em B, paciente 198/03 que apresenta as mutações P205S e G542X e ilustra o comportamento de um tecido que possui atividade residual de *CFTR*. Em C, paciente 113/00 (L.F.A.) que possui a mutação F508del em homozigose e ilustra um tecido que não possui atividade de *CFTR*. A primeira seta mostra o efeito do IBMX/forskolin (estímulo por AMPc) e a segunda o efeito do carbacol (estímulo por Ca^{+2}).

Após estímulo por Ca^{+2} , a resposta esperada é de abertura acentuada de *CFTR* e concomitante abertura de canais de potássio. Em pacientes com atividade normal de *CFTR* a resposta esperada é de uma queda brusca e acentuada da *Vte* que mascara a saída de íons K^{+} (Figura 44 A). Pacientes com atividade residual de *CFTR* tendem a ter aumento brusco da *Vte* consequente da secreção de K^{+} seguido da diminuição de *Vte* consequente da secreção de cloreto (Figura 44B). A resposta varia com o nível de atividade que o canal apresenta. Pacientes sem

atividade de CFTR apresentam aumento de V_{te} , após estímulo por Ca^{+2} consequente somente da saída luminal de potássio (Figura 44C).

Após a análise dos dados fisiológicos foi possível ver relação entre os dados qualitativos e quantitativos de secreção de cloreto pela CFTR (figura 45).

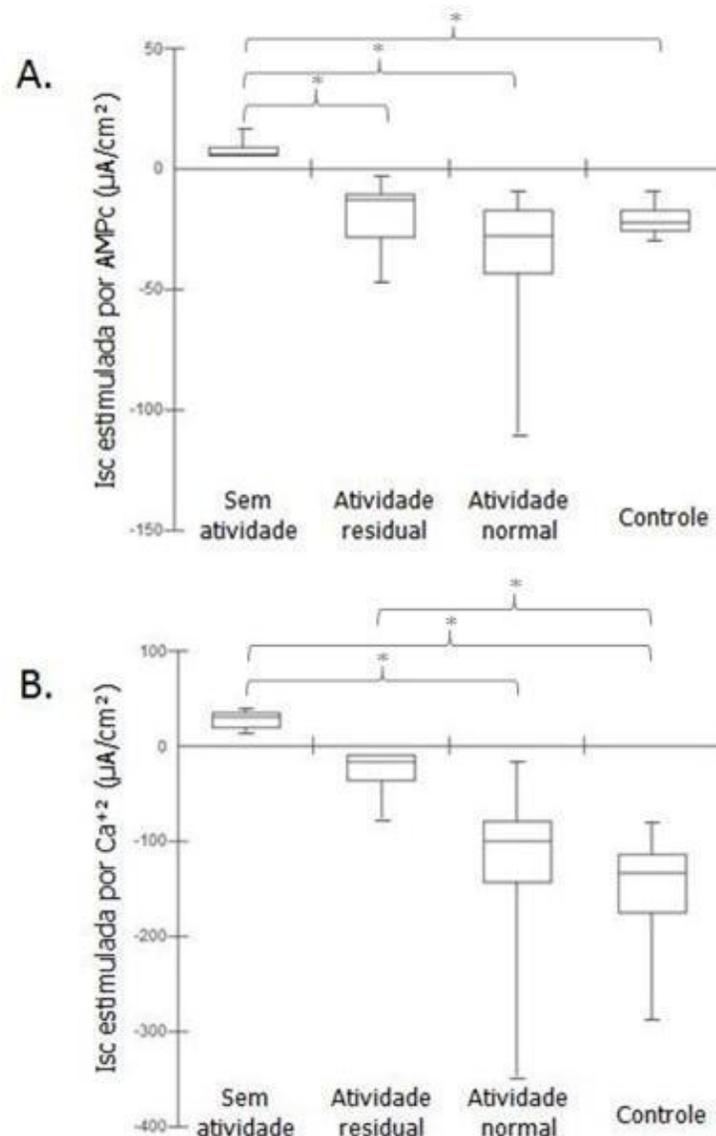


Figura 45. Relação entre os dados qualitativos e quantitativos obtidos em micro-câmara de Ussing. Em A, valor de corrente de curto circuito (Isc) obtida por estimulação dos canais presentes na membrana por AMPc. Em B, Isc obtida por estimulação dos canais presentes na membrana por Ca^{+2} . A análise de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos indicados por chave, onde o $*=p\leq 0,05$.

4. Correlação entre os aspectos clínicos, genéticos e fisiológicos

A fim de mostrar a relação entre a classe de mutação e a gravidade da doença os pacientes que tiveram o genótipo definido foram agrupados em pacientes com mutações de classe I e II, onde se espera um fenótipo mais grave e pacientes onde pelo menos uma das mutações eram de classe IV, V ou VI, como mostra o quadro 18.

Quadro 18. Grupo dos pacientes que tiveram os alelos de *CFTR* genotipados e valores indicadores de gravidade.

Grupos	Código	Idade ao diagnóstico (anos)	Escore de Shwachman	VEF ₁ (%)	Índice de Tiffeneau (%)	FEF _{25-75%} (%)
Classes I, II e III	501/05	1,5	60	45	74	19
	1322/05	2,5	60	50	71	26
	813/01	1	50	37	62	17
	456/07	18,5	70	67	79	49
	535/01	2	50	33	62	15
	973/01	4	55	44	63	18
	715/02	8	65	66	62	37
	719/02	2	50	72	73	47
	2459/04	1	45	41	74	29
	173/08	5	55	58	59	24
	113/00	7	65	77	78	54
Classes IV, V e VI	616/10	49	95	90	91	123
	841/10	35	60	60	87	60
	694/00	1	95	116	89	132
	198/03	21	40	47	62	25
	175/08	12	55	59	79	50
	260/09	31	40	61	102	73
	68/11	8	80	59	66	30
	411/01	19	80	40	77	23
Z(U)*		2,601	0,991	1,073	2,229	2,147
<i>p</i>		0,009	0,322	0,283	0,026	0,032

Os valores de referência de gravidade do escore de Shwachman-Kulczycki são: de 86 a 100 excelente, de 71 a 85 bom, de 56 a 70 médio, de 41 a 55 moderado e menos de 40 grave. Com relação aos parâmetros de espirometria avaliados (FEV₁, Índice de Tiffeneau e FEF_{25-75%}), quanto menor o valor, pior a função pulmonar. Índice de Tiffeneau abaixo de 80% indicam obstrução e abaixo de 60%, restrição.

* Mann-Whitney.

Os aspectos clínicos que apresentam associação com as classes de mutação são a idade ao diagnóstico e os parâmetros de função pulmonar: índice de Tiffeneau e FEF_{25-75%} e estão ilustrados na figura 46.

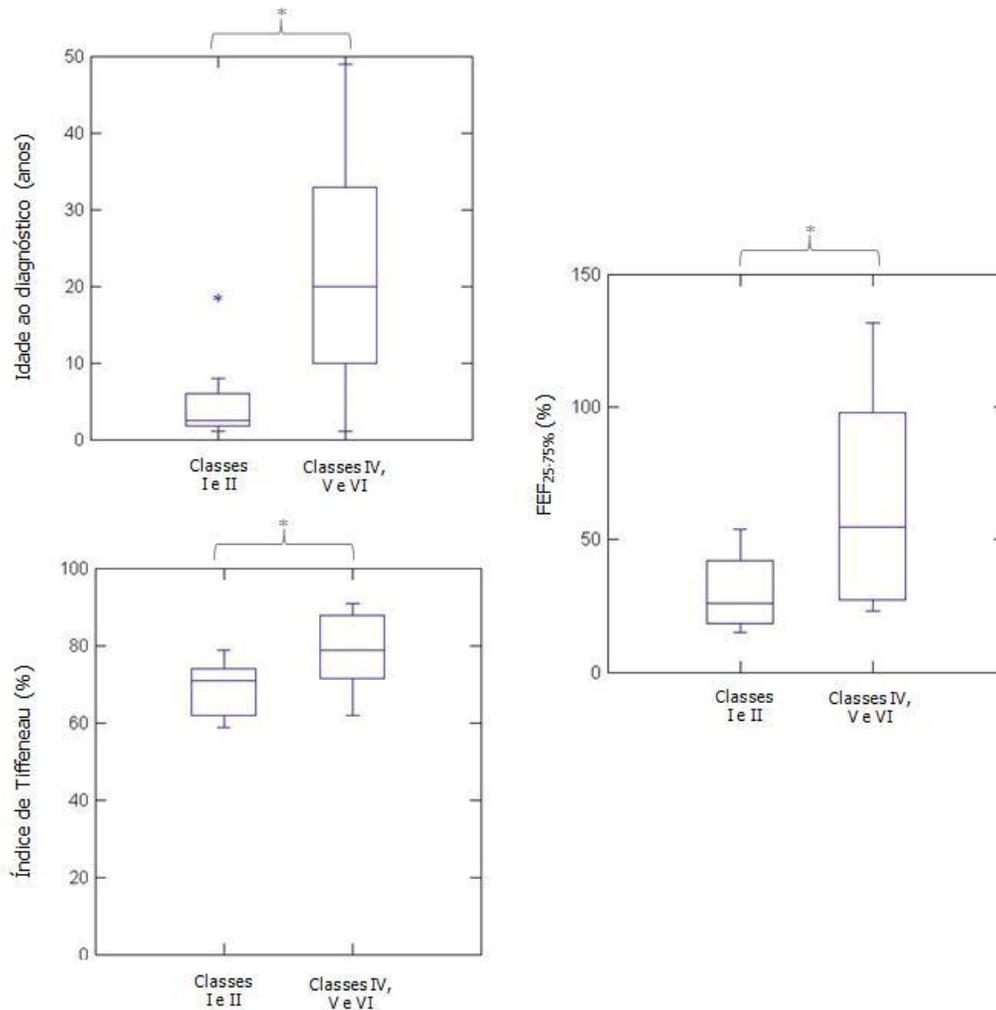


Figura 46. Relação entre as classes de mutação e os marcadores de gravidade: idade do paciente ao diagnóstico, Índice de Tiffeneau e FEF_{25-75%}. A análise de Mann-Whitney mostrou diferença significativa entre os grupos indicados por chave, onde o $*=p\leq 0,05$.

As análises que se seguem foram realizadas considerando principalmente o agrupamento pela atividade de CFTR dada pela análise qualitativa em micro-câmara de Ussing. Essa análise detecta a atividade real do canal, mesmo em indivíduos onde a mutação não foi identificada aumentando o N em cada grupo, conseqüentemente melhorando o poder de análise dos resultados. O quadro 19 mostra a relação entre a atividade de CFTR e a classe de mutações. Note a grande

correspondência entre a atividade de CFTR e a presença de pelo menos um alelo das classes IV, V ou VI de mutação de *CFTR*.

Quadro 19. Agrupamento dos pacientes com relação a função de CFTR, genótipos associados e a classe da mutação de menor efeito.

Código	Iniciais	Genótipo	Classe da mutação mais leve	Análise qualitativa em micro-câmara de Ussing
113/00	L. F. A.	F508del/F508del	Classe II	Sem atividade
535/01	V.A.M.	G542X/2183AA>G	Classe I	Sem atividade
973/01	A. O.	F508del/F508del	Classe II	Sem atividade
715/02	R.F.L.	F508del/F508del	Classe II	Sem atividade
719/02	T. V. P.	F508del/F508del	Classe II	Sem atividade
2459/04	R.C.	F508del/N1303K	Classe II	Sem atividade
173/08	B. S. C.	F508del/F508del	Classe II	Sem atividade
694/00	E. H. L.	F508del/1584-18672pb A>G	Classe IV	Atividade residual
813/01	D. S. C.	G85E/F508del	Classe II	Atividade residual
198/03	M.A.M.	P205S/G542X	Classe IV	Atividade residual
456/07	K.K.S.B.M.	G542X/I618T	Classe II	Atividade residual
175/08	L.S.	P205S/F508del	Classe IV	Atividade residual
260/09	D.R.	F508del/3272-26A>G	Classe V	Atividade residual
554/09	C.S.S.	3120+1G>A/ não identificada	-	Atividade residual
68/11	B. B. R. J.	R334W/F508del	Classe IV	Atividade residual
236/01	L.H.F.	Não identificada	-	Atividade normal
582/01	R.A.S.	Não identificada	-	Atividade normal
589/01	L. H. P.	Não identificada	-	Atividade normal
644/01	L.S.M.	Não identificada	-	Atividade normal
775/01	E.G.A.	Não identificada	-	Atividade normal
790/05	A.A.P.	Não identificada	-	Atividade normal
404/06	C.S.	Não identificada	-	Atividade normal
856/06	M.R.I.	Não identificada	-	Atividade normal
484/07	O. R. F.	Não identificada	-	Atividade normal
331/08	J.S.V.	Não identificada	-	Atividade normal
616/10	A. C. B.	W1282X/4428insGA	?	Atividade normal
841/10	A. G.	F508del/ D1152H	Classe IV	Atividade normal

Onde ?= mutação não classificada, provavelmente de classe IV ou VI.

Em cDNA: A=adenina, T=timina, C=citosina e G= guanina

Na proteína: A=alanina, C=cisteína, D=ácido aspártico, E=ácido glutâmico, F=fenilalanina, G= Glicina, H=histidina, I=isoleucina, K=Lisina, L=leucina, M=metionina, N=Asparagina, P=prolina, Q=glutamina, R=arginina, S=serina, T=treonina, V=valina, W=triptofano, Y=tirosina e X=códon de terminação.

A figura 47 mostra a relação da resposta dos canais presentes no tecido epitelial após estímulo por AMPc e Ca^{+2} quando as amostras são agrupadas pelo resultado qualitativo de função de CFTR ou por classe de mutações. A figura 48 mostra a relação da concentração de cloreto no suor quando as amostras são agrupadas pelo resultado qualitativo de função de CFTR ou por classe de mutações. Note a correspondência entre os valores de secreção de cloreto pelo epitélio intestinal e pelas glândulas sudoríparas quando os pacientes são agrupados por atividade de CFTR ou por classes de mutação de *CFTR*.

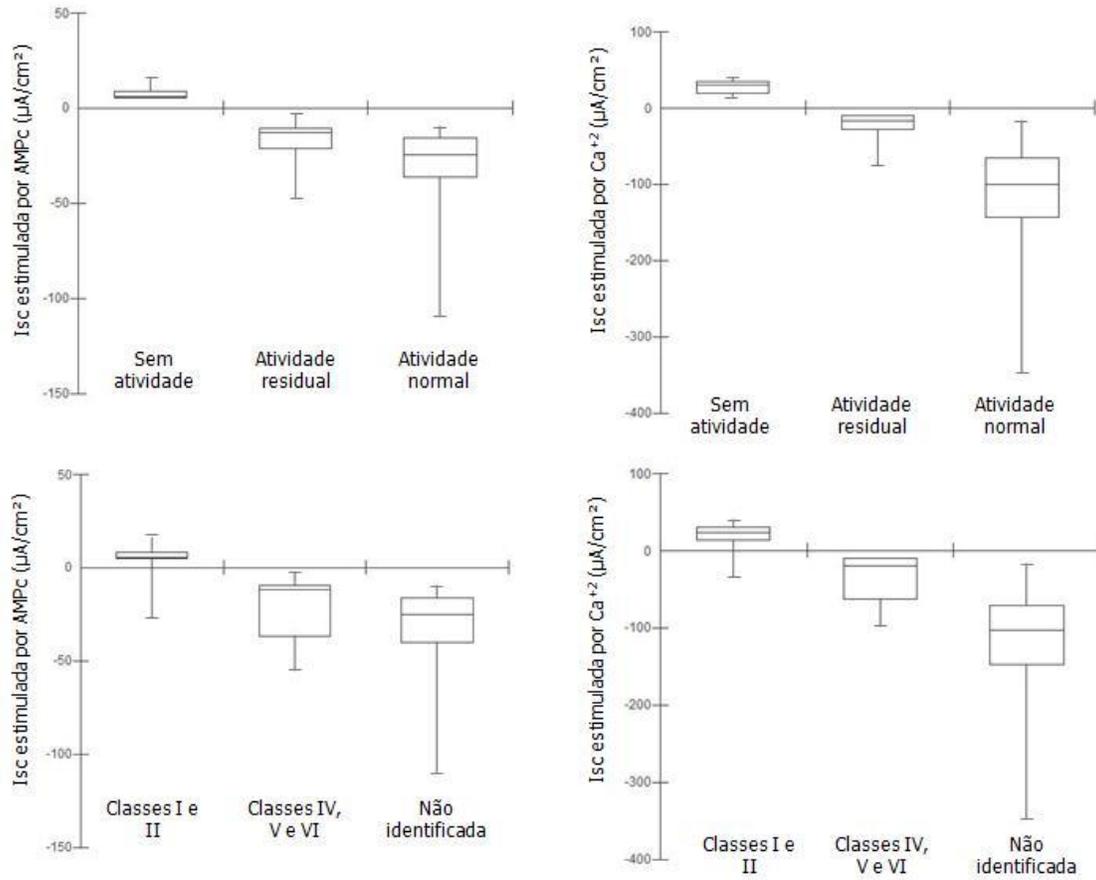


Figura 47. Resposta quantitativa de Isc após estímulo por AMPc e Ca^{+2} agrupados pela atividade de CFTR (A) e pela classe de mutações de *CFTR* (B).

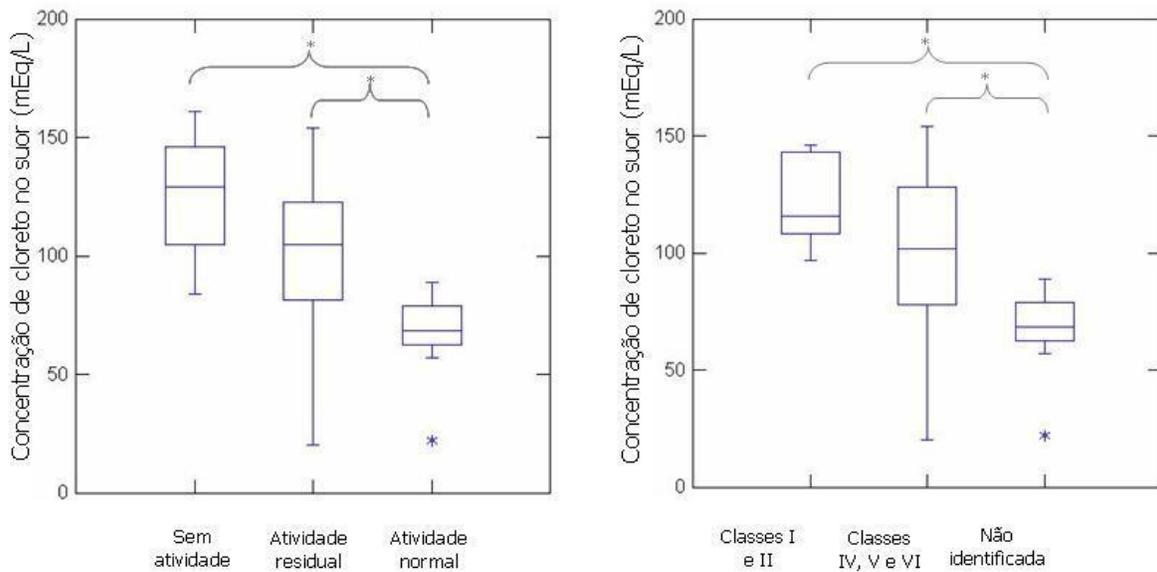


Figura 48. Concentração de cloreto no suor. A análise de Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os grupos indicados por chave, onde o $*=p \leq 0,05$.

A relação entre os valores de secreção de cloreto estimuladas por AMPc e por Ca^{+2} e os marcadores de gravidade (idade ao diagnóstico, VEF₁, CVF, índice de Tiffeneau, FEF_{25-75%}, escore de Bhalla e Shwachman-Kulczycki) está demonstrada na tabela 5.

Tabela 5. Relação entre a atividade de CFTR e marcadores de gravidade.

Marcador de gravidade	Isc estimulada por AMPc		Isc estimulada por Ca^{+2}	
	Coefficiente de correlação de Spearman (r_s)	p	Coefficiente de correlação de Spearman (r_s)	p
Idade ao diagnóstico	-0,352	0,072	-0,379	0,051
VEF ₁ (%)	-0,338	0,085	-0,352	0,071
CVF (%)	-0,082	0,683	-0,152	0,450
Índice de Tiffeneau	-0,476	0,016	-0,384	0,058
FEF _{25-75%} (%)	-0,484	0,012	-0,458	0,018
Escore de Bhalla	0,479	0,051	0,473	0,055
Escore de Shwachman-Kulczycki	-0,322	0,125	-0,408	0,048

Onde negrito=estatisticamente significativo.

* Teste de correlação de Spearman.

Os marcadores de gravidade que apresentaram associação significativa com os valores de secreção de cloreto, seja estimulada por AMPc seja por Ca^{+2} , estão ilustradas na figura 49. Em relação aos parâmetros de função pulmonar, é notável a associação entre a obstrução das vias aéreas e a ausência de atividade de CFTR, já que todos os pacientes sem atividade de CFTR apresentam índice de Tiffeneau abaixo de 80 enquanto que os pacientes com atividade normal de CFTR tendem a apresentar esse índice acima de 80 (Figura 49, Tabela 6). As pequenas vias aéreas tendem a ser mais comprometidas em pacientes sem atividade de CFTR, já que muitos desses pacientes apresentam FEF_{25-75%} abaixo de 40% enquanto pacientes com atividade normal tendem a apresentar o mesmo parâmetro acima desse valor (Figura 49, Tabela 6). A gravidade do quadro clínico avaliado por escore de

Shwachman-Kulczycki tende a ser maior em pacientes sem atividade de CFTR, que apresentam esse escore abaixo de 70, enquanto os que possuem atividade normal de CFTR tendem a ter o escore acima desse valor. Em geral, pacientes com atividade residual de CFTR tendem a apresentar valores de marcador de gravidade comuns aos dois grupos.

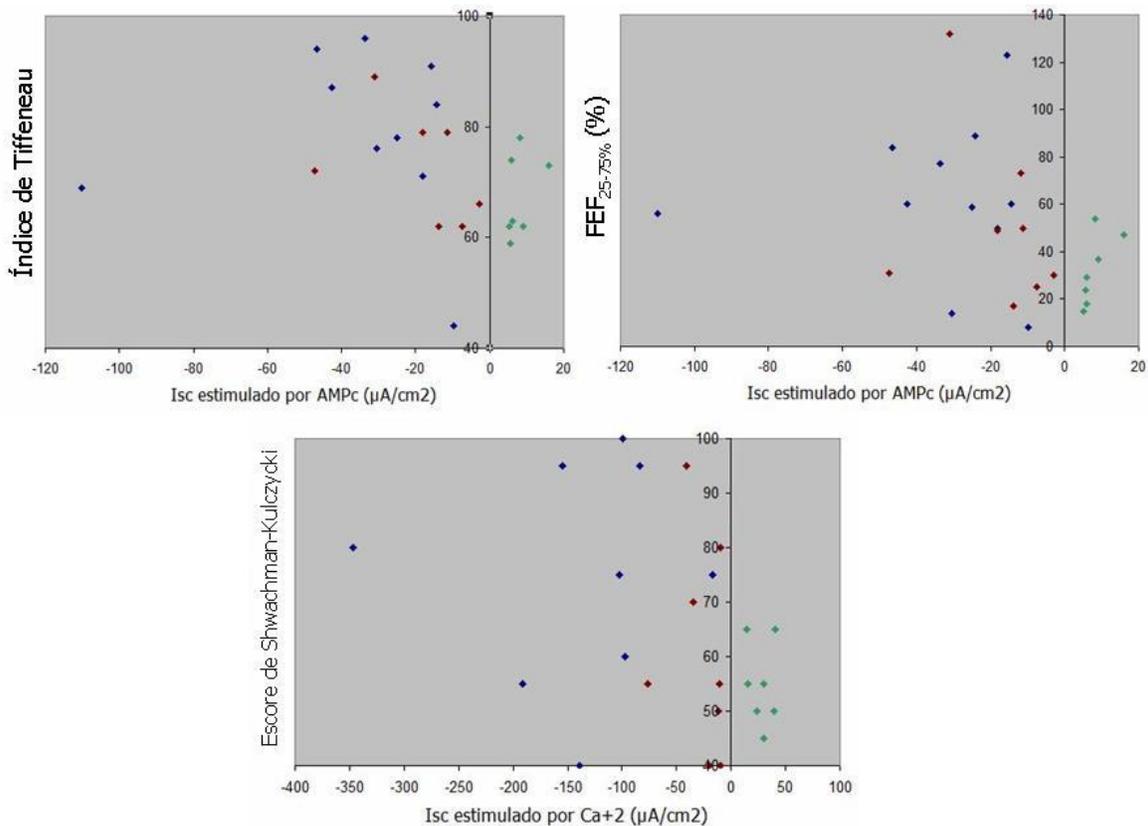


Figura 49. Resposta quantitativa de Isc após estímulo por AMPc ou por Ca²⁺ e relação com marcadores de gravidade clínica. O gráfico mostra todos os valores obtidos para cada paciente, identificados diferencialmente quanto à atividade de CFTR. Pacientes sem atividade (marcador verde), com atividade residual (marcador vermelho) e com atividade normal (marcador azul).

Tabela 6. Distribuição dos pacientes em faixas de gravidade da função pulmonar e relação com a atividade da CFTR.

Indicador de gravidade	Faixa	Indivíduos com atividade normal de CFTR (%)	Número de indivíduos com atividade residual de CFTR (%)	Número de indivíduos sem atividade de CFTR (%)
VEF ₁	≤70%	41,7% (5/12)	87,5% (7/8)	71,4 % (5/7)
	>70%	58,3% (7/12)	12,5% (1/8)	28,6% (2/7)
Índice de Tiffeneau	≤80%	50% (5/10)	75% (6/8)	100% (7/7)
	>80%	50% (5/10)	25% (2/8)	0% (0/7)
FEF _{25-75%}	≤40%	18,2% (2/11)	50% (4/8)	71,4% (5/7)
	>40%	81,8% (9/11)	50% (4/8)	28,6% (2/7)

Apesar de não significativa a associação entre idade ao diagnóstico e secreção de cloreto após estímulo por Ca⁺² e escore de Bhalla e secreção de cloreto após estímulo por AMPc, o valor de p encontrado sugere um tendência de associação ($p=0,051$) (Figura 50) que deveria futuramente ser confirmada, através do aumento do número amostral. Note que pacientes sem atividade de CFTR tendem a ter um diagnóstico mais precoce e um escore de Bhalla indicando maior gravidade.

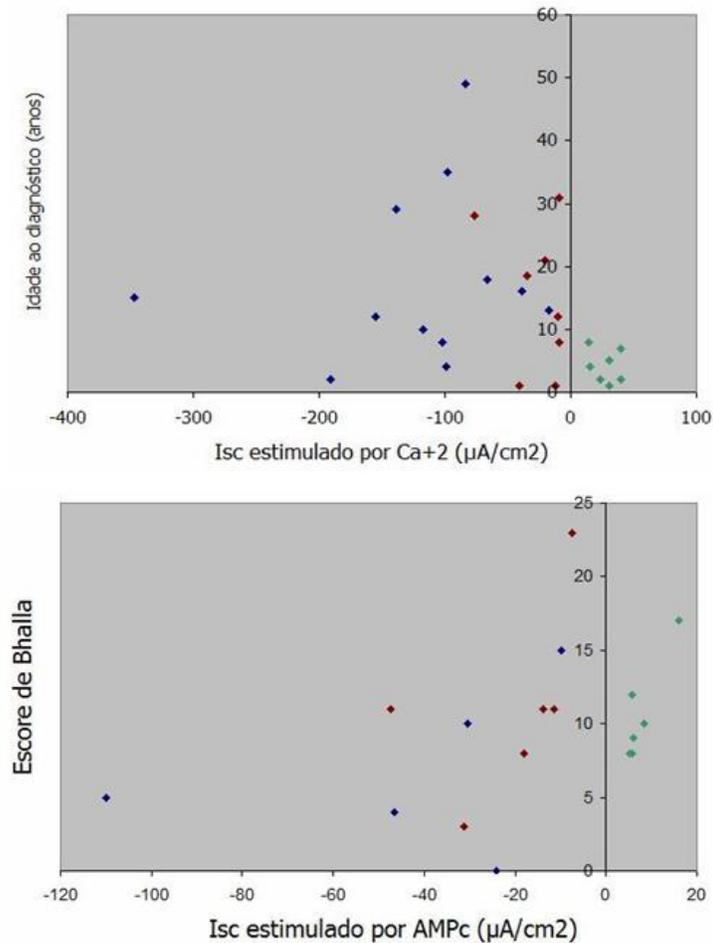


Figura 50. Relação entre idade ao diagnóstico e secreção de cloreto após estímulo por Ca⁺² e entre o escore de Bhalla e a secreção de cloreto após estímulo por AMPc. O gráfico mostra todos os valores obtidos para cada paciente, identificados diferencialmente quanto à função de CFTR. Pacientes sem função (marcador verde), com função residual (marcador vermelho) e com função normal (marcador azul).

A tabela 7 mostra a proporção das comorbidades associadas à FC e sua relação com a atividade de CFTR. É possível notar uma relação entre a insuficiência pancreática e a atividade de CFTR, já que 100% dos pacientes sem função de CFTR apresentam IP, enquanto apenas 27,3% dos indivíduos com função normal de CFTR possuem essa comorbidade. O mesmo é possível ver em relação à intolerância a glicose que é encontrada em 71,4% dos pacientes sem

atividade de CFTR e em 9,1% de pacientes com atividade de CFTR normal (Tabela7).

Tabela 7. Apresentações clínicas relacionadas à FC.

Características avaliadas	Atividade de CFTR (n paciente que apresentam a característica/n total de pacientes do grupo)		
	Normal	Residual	Sem função
Insuficiência pancreática	27,3 % (3/11)	57,1% (4/7)	100,0% (7/7)
Intolerância à glicose	9,1% (1/11)	12,5% (1/8)	71,4% (5/7)
Íleo meconial	0,0% (0/11)	0,0% (0/8)	14,3% (1/7)
Polipose nasal	18,2% (2/11)	37,5% (3/8)	14,3% (1/7)
Osteoporose/osteopenia	33,3% (4/12)	25,0% (2/8)	57,1% (4/7)
Colonização crônica por <i>Staphylococcus aureus</i>	71,4%(5/7)	62,5% (5/8)	71,4% (5/7)
Colonização crônica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28,6% (2/7)	75,0% (6/8)	42,9% (3/7)

5. Discussão

A melhora no tratamento - seja por atenção multidisciplinar ao paciente, por aderência ao tratamento pelos pacientes ou surgimento de novas terapias - e o diagnóstico precoce têm mudado o cenário demográfico da fibrose cística no mundo. A expectativa de vida dos pacientes está aumentando e torna-se necessário um novo olhar para a questão, uma vez que as necessidades clínicas e socioeconômicas mudam de acordo com a faixa etária. Dentro dessa nova perspectiva, estudos que caracterizem esse grupo cada vez mais numeroso são de grande importância.

1. Aspectos clínicos

Essa pesquisa teve a casuística de 30 pacientes maiores de 18 anos de idade cuja hipótese diagnóstica de fibrose cística foi levantada por profissionais responsáveis por seu seguimento no Hospital das Clínicas da UNICAMP. A média de idade foi de 29,5 (mediana 29 anos). Esses pacientes correspondem a 16,67% dos pacientes atendidos no HC com suspeita de FC. Segundo a Fundação Inglesa de FC (71), em 2009, a proporção de pacientes adultos no Registro de Pacientes com FC era de 47%, porém conclusões acerca da proporção de pacientes adultos nesse Centro de Referência em FC não podem ser realizadas, uma vez que para essa pesquisa, não foi feita uma busca ativa por todos os pacientes com clínica sugestiva mas sim uma indicação por médicos responsáveis, somado ao fato de uma proporção de pacientes com clínica sugestiva, não terem consentido participar da pesquisa, fazendo com que o dado de proporção se apresentasse, sob esse

aspecto, subestimado. Por outro lado, muitas características clínicas da FC são comuns a outras doenças que atingem adultos e sob esse aspecto o dado de proporção poderia estar superestimado.

O teste do suor através da iontoforese quantitativa pela pilocarpina é o padrão-ouro para a confirmação do diagnóstico de FC (94, 95). Não foi possível acessar os valores referentes a duas análises de cloreto no suor de três dos 30 pacientes participantes da pesquisa (dois deles têm apenas valores de um teste). Em dois dos 27 pacientes onde foi possível acessar os resultados do teste de cloreto no suor, os valores apresentados estavam dentro da normalidade e a hipótese diagnóstica foi levantada pelo quadro de insuficiência pancreática em um dos casos e de comprometimento respiratório no outro. Três pacientes apresentaram um teste com valor de cloreto no suor alterado e outro com valor limítrofe e um paciente apresentou um teste alterado e o outro normal. Em 77,8% dos pacientes (21 de 27) com dois testes de cloreto no suor realizados, portanto, os valores se apresentaram alterados, acima dos níveis considerados normais ou intermediários. É importante ressaltar que essas proporções estão sendo expostas como caracterização da amostra que compõe essa pesquisa e não refletem dados estatísticos de proporção esperada para adultos, uma vez que esse teste é utilizado como critério diagnóstico e, conseqüentemente, leva a um viés de seleção, ou seja, existe tendência dos pacientes indicados à participar da pesquisa apresentarem teste do suor alterado.

Em relação às manifestações gastrointestinais, cerca de 15% de crianças

com fibrose cística nascem com íleo meconial (63), com uma variação de 13-20% dependendo do estudo avaliado (96, 97). Entretanto, essa apresentação clínica foi observada em 1 dos 29 pacientes, onde foi possível o acesso a essa informação (3,4%). Como a frequência de íleo meconial dos pacientes FC acompanhados no Ambulatório de Mucoviscidose do HC/UNICAMP se assemelha a esperada de 15% (dados ainda não publicados), a baixa frequência na amostra de pacientes participantes da pesquisa poderia refletir uma maior probabilidade de casos com íleo meconial se associarem à progressão clínica mais grave e ao pior prognóstico da doença, sendo menos frequente em pacientes adultos. De fato, pacientes que apresentam mutações das classes I, II e III apresentam maior proporção de íleo meconial ao nascimento (98). Porém, Efrati e colaboradores (2010), na pesquisa cuja finalidade foi avaliar características clínicas e taxas de sobrevivência entre pacientes israelenses, chegaram a conclusão de que as apresentações clínicas como função pulmonar e *status* nutricional, bem como a taxa de sobrevivência não variam entre os pacientes que apresentaram ou não íleo meconial ao nascimento (99). Com o avanço dos estudos moleculares em FC, vários genes moduladores da gravidade vem sendo descritos (51). Assim, uma nova possibilidade para explicar a baixa frequência de íleo meconial nos pacientes que participaram da pesquisa seria a de a composição genômica desses indivíduos seja responsável pela ausência do fenótipo. De fato, essa apresentação clínica é influenciada por genes modificadores, tanto de efeito protetor como causador (100). A insuficiência pancreática está presente em aproximadamente 95% de pacientes com FC (63,

100) e estudos anteriores têm mostrado a correlação entre o íleo meconial e o *status* pancreático (100, 101). A frequência de insuficiência pancreática na amostra foi de 57,1% (16/28) pacientes, onde o acesso a essa informação foi possível. A alta prevalência de pacientes com suficiência pancreática numa amostra composta por adultos corrobora a ideia levantada anteriormente de que pacientes que apresentam tanto insuficiência pancreática como íleo meconial tenham pior prognóstico e diminuição do tempo de vida. A disfunção pancreática é causada pela obstrução de ductos intrapancreáticos pelo muco viscoso (63). Com o tempo o pâncreas sofre autólise, o que leva a perda da função das células das ilhotas de Langerhans ao longo do tempo, provocando assim intolerância à glicose. A frequência de pacientes acima dos 25 anos com intolerância a glicose varia de 30 a 40%, dependendo do estudo avaliado (63, 102). Trinta e quatro e meio por cento dos pacientes participantes da pesquisa apresentaram intolerância a glicose, sendo que nove dos dez que apresentaram esse fenótipo apresentavam insuficiência pancreática como esperado.

A osteoporose, secundária à deficiência de vitamina D, inflamação sistêmica crônica e uso de corticosteroide, está sendo reconhecida como uma complicação da FC (63). A osteopenia começa na infância, mas se manifesta na idade adulta. A reabsorção óssea excede a formação dos osso mesmo em pacientes bem nutridos e estáveis clinicamente. Em nossa amostra a frequência de osteopenia foi de 33,3% (10 de 30 pacientes), ou seja, dentro da esperada segundo Paccou (103).

A função pulmonar é um marcador de gravidade importante em pacientes

com FC, já que aproximadamente 90% dos pacientes morrem devido à progressão da doença pulmonar (104). As médias de VEF₁, CVF, Tiffeneau e FEF_{25-75%} nos pacientes participantes da pesquisa foram respectivamente de 58,8±25,4%, 69,1±23,1, 73,8±14,4 e 45,9±31,2. Os valores de VEF₁ e CVF são similares aos encontrados num estudo realizado por Andrade e colaboradores (2001) em pacientes de Porto Alegre (105) nessa mesma faixa etária, porém os valores do índice de Tiffeneau e do FEF_{25-75%} são superiores quando comparados aos valores encontrados no mesmo estudo (63% e 30%, respectivamente). Esses resultados sugerem que a evolução clínica pulmonar dos pacientes participantes da pesquisa está mais lenta, com menores índices de obstrução pulmonar e comprometimento das pequenas vias aéreas, quando comparada aos pacientes de Porto Alegre. Essas diferenças podem estar associadas a diferente conduta clínica, tipo de tratamento, adesão ao tratamento, ou mesmo clima, composição genômica, entre outras. Um resultado interessante foi o da associação entre a colonização crônica por *P. aeruginosa* e a piora no quadro pulmonar, relação essa já conhecida na literatura (106). Houve diferença significativa entre os valores de VEF₁ e CVF nos pacientes não colonizados comparados aos colonizados cronicamente por essa bactéria. Ambos os marcadores indicam um aumento no quadro pulmonar obstrutivo em pacientes que são colonizados pela *P. aeruginosa*.

2. Aspectos moleculares

Devido à frequência elevada da mutação F508del em pacientes com FC, a

pesquisa por essa mutação deve ser realizada em primeiro lugar, visando excluir pacientes homozigotos F508del das análises onde o método diagnóstico é mais caro e laborioso. Em nossa amostra, a frequência dessa mutação foi de 30% dos alelos analisados, sendo encontrado homozigose em 16,7% dos pacientes e heterozigose em 26,7%. Essas frequências são baixas quando comparada às de estudos brasileiros onde 50% de alelos de pacientes FC são F508del e 30% dos pacientes são homozigotos (31, 37). Esses estudos, entretanto, contemplam pacientes FC de todas as idades e não somente os adultos e é esperado que, entre adultos, prevaleça mutações ligadas a fenótipos mais brandos. O método de triagem de mutações por DHPLC mostrou-se bastante eficiente e resultou na detecção de apenas 16 regiões candidatas ao sequenciamento dos 113 fragmentos avaliados por esse método, levando a identificação de cinco dos alelos associados à FC e oito variações de sequências não associadas à clínica da doença. O sequenciamento dos três fragmentos restantes que apresentaram padrão de retenção alterado no DHPLC não mostrou nenhuma alteração molecular. Houve falha na detecção de alteração no fragmento que continha a mutação p.R553X, identificada posteriormente por sequenciamento. Por análises com auxílio Software Navigator TM, é possível melhorar as condições de análise e prever a resposta *in silico*, possibilitando dessa forma à otimização do método sem gastos de reagentes. Na pesquisa realizada por Ravnik-Glavak e colaboradores (2002) (87) foram também necessários alguns ajustes após a determinação prévia das condições de análise. A vantagem do método de DHPLC é a alta sensibilidade

quando comparada a outros métodos de triagem e a rapidez quando comparada ao sequenciamento, porém, em termos de custos, a técnica se equipara ao sequenciamento direto com a desvantagem de só indicar onde há a alteração sem identificá-la (86). O DHPLC é o método indicado quando há necessidade de um diagnóstico rápido. Com relação a aplicação dessa técnica para o gene *CFTR*, essa pesquisa mostrou que os fragmentos que contêm o exons 6b e 10 devem ser sequenciados diretamente, uma vez que a frequência elevada de dois polimorfismos (TTGA_n e M470V) leva à formação de muitos padrões de retenção alterados.

A técnica de sequenciamento automático direto a partir da PCR, permitiu o diagnóstico molecular de 12 dos 24 pacientes que ainda não haviam sido genotipados pelos outros métodos, além de identificar uma das mutações de um paciente participante da pesquisa. Uma vez que os fragmentos utilizados no sequenciamento contemplavam as regiões mais prováveis de mutação, segundo o banco *Cystic Fibrosis Mutation Database* (39), era esperado encontrar por essa técnica quase a totalidade dos alelos responsáveis pelo quadro clínico de FC nos pacientes. Porém, como a maior parte das regiões não codificantes ou da região promotora do gene *CFTR* não foram avaliadas nessa pesquisa, existe ainda a possibilidade de que justamente nestas regiões se localizem as mutações responsáveis pelo quadro clínico sugestivo de FC nos pacientes não genotipados. De fato, são conhecidas mutações no meio de introns que criam sítios alternativos de processamento do RNA, levando à produção de transcritos normais e alterados

em proporções específicas para cada mutação, como as alterações IV8-5T que leva à formação de um RNA mensageiro variante sem o exon 9 (107); 1584-18672pb A>G que resulta na inserção de um pseudo-exon de 104pb entre os exons 10 e 11 (90) e a 3849+10Kb C>T, que cria um sítio de *splicing* alternativo no intron 19 (108). Apesar de serem descritas como raras, as alterações 1584-18672pb A>G e 3849+10Kb C>T foram avaliadas por estarem associadas a quadros clínicos mais leves, portanto de grande interesse nessa pesquisa, e a alteração 1584-18672pb A>G foi encontrada em um dos doze pacientes que ainda não tinham o diagnóstico molecular concluído. A alteração IV8-5T não foi avaliada por problemas metodológicos.

A técnica de MLPA foi a última análise molecular realizada na tentativa de identificar as mutações responsáveis pela clínica sugestiva de FC, uma vez que cada vez mais grandes duplicações e deleções que escapam à técnica de sequenciamento convencional vem sendo descritas (88). Nenhum dos onze pacientes que não tiveram a genotipagem concluída apresentou mutações desse tipo. Essa técnica também foi usada nos cinco pacientes que apresentaram homozigose para a alteração F508del e na paciente que apresentou homozigose para a alteração A561E, a fim de determinar se o resultado do sequenciamento se devia à homozigose ou à perda de heterozigose por grandes deleções. O resultado da análise foi consistente com homozigose. É importante destacar que em pacientes adultos, cujo fenótipo tende a ser mais brando, alterações desse tipo não são esperadas a não ser em heterozigotos compostos com o outro alelo de

gravidade menor, ou seja, apresentando mutações de classes IV, V ou VI. O método de MLPA foi de simples implementação, não sendo necessária nenhuma otimização e, realizado sob as instruções do fabricante, os resultados obedecem ao padrão de qualidade necessários para a confiabilidade. Entretanto, como se trata de um método de alto custo, para testar a perda de heterozigose o mais indicado é a convocação dos genitores e pesquisa direta da mutação do paciente, quando for possível, já que a presença da mesma mutação em heterozigose nos pais leva a maior confiabilidade sobre o genótipo do filho.

Em resumo, em 39 dos 60 alelos analisados (30 pacientes), a mutação foi identificada e 59% (23/39) dos alelos apresentaram mutações de classe II, 20,5% (8/39) de classe I, 12,8% (5/39) de classe IV, 5,1% (2/39) de classe V e 2,6% (1/39) de provável classe VI. Não existem estudos de frequência das classes de mutações no Brasil. Koch e colaboradores (2001) (109) determinaram que 1,9% dos alelos de pacientes com o diagnóstico de FC possuem mutações de classe IV ou V, uma baixa frequência quando comparada à de nossa amostra (17,6%). Participaram da pesquisa de Koch e colaboradores 5020 pacientes registrados no Registro Europeu de Epidemiologia da FC (109). Entretanto, no continente Europeu a frequência da F508del é muito superior à frequência descrita no Brasil e, em estudos de frequências de mutações, a composição étnica da população avaliada é extremamente importante. Além disso, é preciso ressaltar que pacientes de classe IV e V tem fenótipo mais brandos e podem ou escapar ao diagnóstico ou apresentar diagnóstico mais tardio. Portanto, era esperado encontrar uma

frequência alta desse tipo de mutação em nossa amostra, que é composta de pacientes adultos.

3. Aspectos fisiológicos

Como foi possível perceber nos resultados discutidos até o momento, é muito difícil chegar ao diagnóstico conclusivo de FC em casos onde a clínica é controversa, mesmo quando se utiliza técnicas como as de biologia molecular. Dentro dessa realidade, estudos que acessam diretamente a proteína CFTR e sua atividade podem contribuir muito com o diagnóstico. Dois métodos têm sido utilizados para identificar a atividade do canal CFTR: medidas da diferença de potencial nasal (NDP, do inglês *nasal potential difference*) (110, 111, 112) e medidas da corrente intestinal (ICM, do inglês *intestinal current measurement*) (95, 112, 113). No primeiro caso, dois valores de NDP anormais obtidos em dias diferentes podem ser usados como evidência de disfunção da CFTR. Entretanto, para a realização desse procedimento, é necessária a imobilização do paciente por muito tempo, o que é difícil de ser realizado em indivíduos com menos de seis anos de idade (faixa etária comum aos pacientes com FC), sendo necessários profissionais altamente qualificados e padronização do procedimento para minimizar as variações (110). Outra limitação do método é a sobreposição de alguns valores entre pacientes com FC, portadores de mutações e indivíduos normais (114, 115, 116), o que diminui a especificidade do método. O método de medidas bioelétricas da corrente intestinal tem se mostrado bastante

discriminatório no que diz respeito ao acesso da atividade de CFTR (113), com a vantagem de ser um método de fácil implementação e alta reprodutibilidade, principalmente no que diz respeito à caracterização qualitativa da atividade de CFTR. A micro-câmara de Ussing montada nessa pesquisa está sendo a primeira utilizada no Brasil para efeito de pesquisa e diagnóstico em pacientes com FC. Em três dos 30 pacientes participantes da pesquisa, não foi possível a obtenção dos dados porque a resistência dos tecidos analisados não atingiu o valor de qualidade necessário para a confiabilidade dos resultados. Os resultados qualitativos foram: 30% (7/27) dos pacientes não apresentaram atividade de CFTR, 29,6% (8/27) dos pacientes apresentaram atividade residual de CFTR e 44,4% (12/27) dos pacientes apresentaram atividade normal de CFTR. Com relação aos dados quantitativos, a resposta de secreção de íons cloreto, após estimulação por AMPc, se mostrou mais adequada na discriminação de pacientes sem atividade de CFTR daqueles que possuíam atividade, seja residual, seja normal. A resposta à estimulação por Ca^{+2} foi adequada para discriminar os pacientes que possuíam atividade residual de CFTR dos controles sem FC. Existe, porém, sobreposição de valores de secreção de cloreto após ambos os estímulos (AMPc e Ca^{+2}) nos pacientes com atividade de CFTR residual e normal. Assim como nessa pesquisa, Hirtz e colaboradores (2004) (113) conseguiram resultados discriminatórios após indução por AMPc. Entretanto, apesar de a distribuição encontrada pelos autores ser significativamente diferente, ainda houve sobreposição de valores quando comparados pacientes residuais, portadores de uma mutação no gene CFTR e controles normais. Esses resultados

sugerem que as medidas bioelétricas da corrente intestinal não são adequadas, isoladamente, para o diagnóstico de FC e sim uma ferramenta que somada a outras, pode contribuir para a realização do mesmo.

A respeito do método é importante salientar que ele também exige um treinamento e aprimoramento, tanto do profissional que prepara o espécime para a análise e opera a câmara de Ussing, como do profissional que realiza as biópsias. Isso foi evidenciado tanto pela melhora na qualidade do tecido das análises recentes quando comparadas às análises antigas, que apresentaram resistência mais adequada, como pela reprodutibilidade dos resultados nas três a cinco biópsias (dados não mostrados).

4. Correlações entre a clínica, a genética e a fisiologia de pacientes com FC

A) Relação entre tipos de mutação e gravidade da doença

Na tentativa de observar a tendência à clínica mais grave nas mutações das classes I e II, quando comparadas às de classes IV, V e VI, foram realizados o agrupamento dos pacientes que tiveram o genótipo identificado pelo diagnóstico molecular e uma comparação com os dados clínicos. Não houve associação entre o escore de Shwachman-Kulczycki, VEF_1 e outros marcadores de gravidade com as classes de mutações. Entretanto, houve tendência dos pacientes com mutações

mais graves a terem um diagnóstico mais precoce [média=4,77±5,14 (Classes I e II); média=22±15,7(Classes IV, V e VI)] e a apresentarem maior propensão a comprometimento respiratório obstrutivo [Índice de Tiffeneau: média de =68,81±7,31 (Classes I e II); média=81,63±13,33 (Classes IV, V e VI)], com maior impacto das pequenas vias aéreas [FEF_{25-75%}:média=30,45±14,09 (Classes I e II); média=64,50±42,68 (Classes IV, V e VI)].

B) Relação entre a atividade de CFTR e os genótipos dos pacientes

De uma maneira geral, o grupo que não apresentou atividade de CFTR na análise em micro-câmara de Ussing (7/27) foi composto por pacientes com mutações de classes I e II, como esperado; o grupo que apresentou atividade residual de CFTR (8/27) se constituiu de genótipos heterogêneos, porém com alta frequência de heterozigotos compostos, nos quais uma das mutações era de classe IV, V e VI (5/8), não sendo esperado, contudo, indivíduos com mutações consideradas graves nesse grupo (3/8); o grupo que apresentou atividade de CFTR normal (12/27), foi composto de pacientes que ou não tiveram a mutação no gene *CFTR* identificada ou apresentaram-se como heterozigotos compostos nos quais uma das mutações é sabidamente leve (117, 118). Segue informações detalhadas sobre cada grupo para que as discussões seguintes sejam mais claras:

- Grupo sem atividade de CFTR:

Cinco pacientes homozigotos para a mutação F508del, um paciente

heterozigoto composto F508del/N1303K e um paciente heterozigoto composto G542X/2183AA>G.

A mutação F508del, presente no exon 10 é de classe II e se localiza no NBD1 amino-terminal. Essa alteração não permite o dobramento correto da CFTR e seu transporte para a membrana plasmática, sendo na maior parte retida no retículo endoplasmático, onde é alvo da degradação Ub-proteossomal (119). Na pequena porcentagem da proteína F508del-CFTR que chega à membrana, a deleção da fenilalanina leva a um problema de abertura do canal agindo, então, como mutação de classe III (120). Sendo assim, espera-se que portadores dessa mutação tenham mesmo um fenótipo mais grave.

A mutação N1303K, presente no exon 21, é de classe II e se localiza no NBD-2. Da mesma forma que a F508del, é uma mutação que leva à perda de atividade de CFTR.

A mutação G542X, presente no exon 11, é uma mutação de classe I, uma vez que forma um códon de parada prematuro que leva à degradação do RNA mensageiro através do mecanismo de decaimento de RNA mediado pela falta de sentido (38). O mesmo acontece com a mutação 2183AA>G, localizada no exon 13. Essa mutação leva à mudança da matriz de leitura e à criação de um códon de parada prematuro. Ambas eram esperadas dentro desse grupo.

- Grupo com atividade residual de CFTR:

Sete pacientes com diferentes genótipos fazem parte desse grupo.

Os pacientes cuja a atividade residual era esperada são os dos genótipos: i) F508del/1584-18672pbA>G e F508del/3272-26A>G, pois alelos de classe V produzem, além do RNAm anômalo, o RNAm normal de forma que alguma CFTR selvagem é formada (121); ii) os dois pacientes que apresentam a mutação P205S em heterozigose composta com mutações de classe I e II (P205S/G542X e P205S/F508del), já que a mutação P205S presente no exon 6a e localizada no domínio regulatório da proteína, é uma mutação de classe IV que leva à resposta reduzida do canal CFTR ao AMPc e tem sido associada, em muito estudos, a fenótipos mais leves; iii) o mesmo se aplica à mutação R334W, presente no exon 7, encontrada em heterozigose composta com a F508del no paciente 68/11 (122, 123). Apesar da paciente 554/09 apresentar a mutação de classe I, 3120+1G>A que leva ao erro de processamento de todos os RNAm produzidos por esse alelo, é possível que ela forme um heterozigoto composto com uma mutação leve que não foi identificada..

Já os pacientes 813/01 (G85E/F508del) e 456/07 (G542X/I618T) não eram esperados nesse grupo, uma vez que as mutações G85E e I618T são identificadas como de classe II.

A mutação G85E fica no TMD1 e a troca da glicina, um aminoácido neutro, pelo ácido glutâmico, um aminoácido com carga elétrica negativa, poderia levar a problemas de dobramento dessa região apolar segundo Xiong e colaboradores (1997) (124). De fato, nesse mesmo estudo, os autores provam que o transporte de G85E-CFTR para fora do retículo endoplasmático foi similar ao da F508del-

CFTR. Contudo, muitos estudos têm mostrado a mutação G85E associada a quadros clínicos mais brandos (125, 126).

Já a mutação I618T no exon 13, que se localiza no domínio regulatório, foi classificada como de classe II através de um estudo funcional de Vankeerberghen e colaboradores (1998) o qual verificou a ausência da capacidade de maturação da proteína CFTR e consequente ausência dela na membrana (127). Contudo, Pasyk e colaboradores (1998) (128) demonstraram que a proteína I618T-CFTR apresenta atividade parcial como canal de cloreto, exibindo, porém, taxas de abertura de canal defeituosas. Os dados de que há atividade de CFTR no paciente 456/07, portador de I618T, corroboram os resultados de Pasyk e sugerem que essa alteração poderia ser então reclassificada em mutação de classe IV. Dessa forma, o paciente portador dessa mutação se enquadraria nesse grupo.

- Grupo com atividade normal de CFTR:

Dos 11 pacientes desse grupo, o genótipo foi determinado somente em dois.

O paciente 616/10 possui uma mutação de classe I (W1282X), presente no exon 20 que, assim como a G542X explicada anteriormente, forma um códon de parada prematuro que leva à degradação do RNA mensageiro através do mecanismo de decaimento de RNA mediado pela falta de sentido e, como consequência, não há proteína CFTR formada, em heterozigose composta com uma mutação do tipo frameshift (4428insGA), presente no exon 24 e que leva à

formação de um códon de parada prematuro que tem como consequência, a perda de 33 aminoácidos na extremidade C-terminal da proteína (117), incluindo o domínio TRL que se liga a importantes fatores regulatórios (129). Não existem estudos relativos à classificação dessa mutação. A região carboxi-terminal de CFTR está ligada ao processo de reciclagem da proteína da membrana (56). Dessa forma, se a mutação afeta esse processo, ela seria uma mutação de classe VI. Porém, se a mutação afeta a taxa de abertura do canal, ela poderia ser classificada como mutação de classe IV. Contudo, sem estudos funcionais não há possibilidade de determinar o real efeito da mutação 4428insGA. Essa alteração foi descrita sempre associada a CBAVD (117) que é a manifestação clínica mais sensível a pequenas variações da atividade de CFTR (2, 63) e, portanto, esse paciente era esperado nesse grupo, uma vez que a hipótese diagnóstica surgiu após a filha do mesmo ter tido o diagnóstico de FC confirmado e de, através da anamnese, ser descoberto que a criança foi gerada por fertilização assistida.

A paciente 841/10 apresentou genótipo F508del/D1152H. A mutação D1152H é sabidamente uma mutação ligada a quadros clínicos bem leves (118, 130).

A presença desses dois pacientes nesse grupo evidencia que: i) mutações ligadas a quadros clínicos muito leves, ou mesmo à uma grande variabilidade clínica, estão relacionadas à secreções de cloro aparentemente dentro da faixa da normalidade; ii) a análise qualitativa dos traçados obtidos na micro-câmara de Ussing não tem sensibilidade para classificar essas alterações como residuais e,

uma vez que a quantitativa, como já discutido anteriormente, gera sobreposição de valores entre residuais e normais, o exame de fisiologia não consegue definir a totalidade dos casos. Dessa maneira, não se pode excluir a hipótese diagnóstica de FC para os outros 10 pacientes somente com os dados bioelétricos. Entretanto, como já mencionado anteriormente, esses dados podem ser ferramenta de exclusão quando combinado com outros aspectos, como por exemplo, as características clínicas dos pacientes.

C) Relação entre a atividade de CFTR e a clínica dos pacientes

Não existiu associação entre a secreção de cloreto pela CFTR e os marcadores de gravidade VEF_1 , CVF, IMC e SpO_2 . Os pacientes que não apresentaram atividade de CFTR mostraram uma tendência de ter idade ao diagnóstico precoce (média= $4,14 \pm 2,67$) e um escore de Bhalla mais grave, apesar dessa associação não ser estatisticamente significativa ($p=0,051$). Os pacientes com atividade residual de CFTR foram diagnosticados um pouco mais tarde (média= $15,06 \pm 11,48$) e o grupo de pacientes com atividade normal de CFTR, mostrou grande variação na idade ao diagnóstico, mas é o grupo que possui o diagnóstico realizado nas idades mais elevadas (616/10: 45 anos e 840/10: 35 anos). Esse resultado era esperado, uma vez que indivíduos mais graves procuram o serviço médico mais cedo e tendem a ter o diagnóstico precoce.

Com relação à função pulmonar, existiu a tendência de pacientes sem atividade de CFTR ou com atividade residual apresentarem VEF_1 abaixo de 70%,

enquanto pacientes com atividade normal de CFTR apresentaram tendência ao VEF_1 acima desse valor. Existiu associação entre a secreção de cloreto pela CFTR, ou seja, a atividade do canal, e o índice de Tiffeneau e $FEF_{25-75\%}$. Pacientes sem atividade de CFTR tendem a ter quadro pulmonar obstrutivo e com maior comprometimento das pequenas vias aéreas e o aumento da atividade está associado à melhora dos parâmetros de função pulmonar.

Houve associação entre a secreção de cloreto pela CFTR e a gravidade clínica geral dos pacientes avaliada pelo escore de Shwachman-Kulczycki. Pacientes sem atividade de CFTR tendem a ter escore de Shwachman-Kulczycki mais baixos e a gravidade vai diminuindo com o aumento da secreção de cloreto pelo canal.

Com relação à associação da atividade de CFTR com as outras comorbidades, não foi possível encontrar nenhuma tendência nas colonizações crônica do pulmão por bactérias, perda óssea, polipose nasal e íleo meconial. Contudo, foi possível ver uma tendência à insuficiência pancreática e à intolerância à glicose à medida que ocorre a perda da atividade de CFTR, ou seja, uma maior porcentagem de indivíduos do grupo sem atividade do canal apresenta essas duas características clínicas e essa porcentagem vai caindo nos grupo onde há atividade residual e normal de CFTR. Sete dos 17 pacientes do sexo masculino realizaram o teste de espermograma: dois pacientes do grupo sem atividade de CFTR e um do grupo que apresentava atividade normal do canal apresentaram azoospermia e um paciente do grupo que apresentava atividade normal de CFTR apresentou

oligospermia, porém nenhuma conclusão se pode chegar a respeito de frequência, pois tal característica pode ter sido utilizada pelos médicos responsáveis pelo atendimento para a indicação do paciente para a pesquisa. Contudo, todos os pacientes que apresentaram fertilidade normal (4/7) apresentavam atividade normal de CFTR, o que evidencia mais uma vez que esse grupo é formado ou por pacientes que apresentam alterações moleculares com consequência muito sutil na produção de proteína ativa, ou por pacientes cuja clínica é parecida com a FC, porém com etiologia diferente.

5. Considerações finais

Esse estudo faz parte de uma pesquisa mais abrangente que pretende caracterizar todos os pacientes com FC, desde os pediátricos até os adultos, atendidos no centro de referência em fibrose cística do HC/UNICAMP: i) clinicamente, através das avaliações, entre outros aspectos, de evidências da progressão da doença e *status* clínico dos pacientes; ii) fisiologicamente, através de testes laboratoriais direcionados à atividade de CFTR, como aplicação de NDP, ICM e teste de cloreto no suor; iii) geneticamente, por testes moleculares, tanto no gene *CFTR* como em genes que estão sendo descritos como moduladores da gravidade clínica da doença.

A caracterização minuciosa de uma doença é de fundamental importância, principalmente na FC, onde o impacto é multissistêmico, com expressividade variável, alta morbidade e mortalidade. O conhecimento gerado por essa iniciativa

pode ajudar diversas vertentes do atendimento médico, sempre visando melhor assistência, qualidade de vida e atenção ao paciente. Dentro desse propósito, essa pesquisa trouxe importantes contribuições no que diz respeito à caracterização dos pacientes adultos.

Uma contribuição pontual foi o diagnóstico molecular de muitos pacientes. Esse conhecimento traz como benefício para o paciente a definição do diagnóstico, possibilitando o aconselhamento genético. Como aplicação mais geral, o conhecimento das frequências das mutação encontradas na nossa região pode levar a diagnósticos mais direcionados. Muitos esforços têm sido realizados para a identificação e o desenvolvimento de drogas mutação-direcionadas e isso tende a ser uma realidade a curto prazo. Dentro desse cenário, o diagnóstico molecular tende a se popularizar, uma vez que vai ser crítico no tratamento do paciente.

Uma outra contribuição relevante foi a introdução da técnica de eletrofisiologia por micro-câmara de Ussing, a qual, além de auxiliar no diagnóstico podendo ser utilizada como ferramenta conjunta com outros aspectos, possibilita pesquisas na área de descoberta de fármacos que ativam ou corrigem o canal CFTR, mais uma vez com a finalidade de contribuir para o crescente conhecimento na área, beneficiando o paciente.

6. Conclusão

As principais conclusões dessa pesquisa foram:

- a baixa incidência de insuficiência pancreática e íleo meconial na amostra de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de FC sugere que essas condições estão associadas ao pior prognóstico da doença;
- há associação entre colonização crônica por *P. aeruginosa* e o pior quadro pulmonar obstrutivo em adultos com hipótese diagnóstica de FC;
- existe relação entre a secreção de cloreto pela CFTR, a classe de mutação de *CFTR* e a concentração de cloreto no suor em adultos com hipótese diagnóstica de FC;
- houve caracterização genética de 65% dos alelos pesquisados e a proporção de classes de mutações de *CFTR* de I-VI foi de: 20,5%-59%-0%-12,8%-5,1%-2,6% respectivamente;
- as medidas bioelétricas não discriminam os indivíduos sem FC de pacientes adultos com mutações muito leves e de provável efeito sutil sobre a atividade de secreção de cloreto pela CFTR, de forma que não podem ser utilizadas, isoladamente, como ferramenta para exclusão de hipótese diagnóstica;
- a ausência de atividade de CFTR está associada ao diagnóstico mais precoce e a um pior escore de gravidade de Shwachman-Kulczycki. À medida que aumenta a atividade do canal, a idade ao diagnóstico tende a aumentar e a gravidade diminuir.
- que indivíduos sem atividade de CFTR tendem ao quadro pulmonar obstrutivo e com maior comprometimento das pequenas vias aéreas, além de possuírem

maiores chances de apresentar insuficiência pancreática e intolerância à glicose.

- a genotipagem e a avaliação da secreção de íons cloreto pela CFTR podem ser somadas às informações clínicas (as mais relevantes sendo parâmetros de função pulmonar, insuficiência pancreática, intolerância a glicose e os escores de gravidade como os de Shwachman-Kulczycki) para melhorar o diagnóstico da FC, principalmente na população de adultos que possui sutilezas clínicas mais difíceis de serem detectadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pâncreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child* 1938; 56:344.
2. Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:475-82.
3. Farber S. Pancreatic function and disease in early life v. pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life. *Arch Pathol* 1944; 37: 238.
4. Andersen DH e Hodges RG. Celiac syndrome v. genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration etiology. *Am J Dis Child* 1946; 72:62.
5. di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pâncreas. Clinical significance and relationship to disease. *Pediatrics* 1953; 12: 549-63.
6. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23:545-59.
7. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983; 301:421-2.
8. Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fisher N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 1983; 221:1067-70.
9. Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia: abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 1986; 78:1245-52.
10. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analyses. *Science* 1989; 245:1073-80.
11. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.
12. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245:1059-65.
13. Cystic Fibrosis Foundation [Acesso em: 12 jun. 2011] Disponível em: URL:<http://www.cff.org>.
14. Fitzsimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatrics* 1993;122: 1-9.
15. Lewis LG e Cohen MB. A selective advantage for cystic fibrosis carriers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21(1): 117-8.
16. Colonnelli G. Fibrose Cística: Estudo da mutação DF508 e dos marcadores genéticos XV2 e KM 19 em afetados e na população de Belém [Dissertação]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 1999.
17. Salvatore D, Buzzeti R, Baldo E, Fomeris MP, Lucidi V, Manunza D, Marinelli I, Messori B, Neri AS, Raia V, Furnari ML, Mastella G. An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellaneous. *J Cystic Fibrosis* 2011; 10: 71-85.
18. Corey M, Farewell V. Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada 1970-1989. *Am J Epidemiol* 1996; 143:1007-17.
19. Dupuis A, Hamilton D, Cole DE, Corey M. Cystic Fibrosis Birth Rate in Canada: a decreasing trend since the onset of genetic testing. *J Pediatr* 2005; 147:312-5.
20. Valle EP, Burgos RI, Valle JR, Egas Béjar D, Ruiz-Cabezas JC. Analysis of *CFTR* gene mutations and cystic fibrosis incidence in the Ecuadorian population. *Invest Clin* 2007; 48:91-8.
21. Bellis G, Cazes MH, Parant A, Gaimard M, Travers C, Le Roux E, Ravilly S, Rault G. Cystic fibrosis mortality trends in France. *J Cyst Fibros* 2007; 6:179-86.
22. Scotet V, Gillet D, Dugueperoux I, Audrézet MP, Bellis G, Garnier B, Roussey M, Rault G, Parent P, De Braekeleer M, Férec C. Spatial and temporal distribution of cystic fibrosis and

- of its mutations in Brittany, France: a retrospective study from 1960. *Human Genet* 2002; 111(3):247-54.
23. Farrell P, Joffe S, Foley L, Canny GJ, Mayne P, Rosenberg M. Diagnosis of cystic fibrosis in the Republic of Ireland: epidemiology and costs. *Ir Med J* 2007; 100:557-60.
 24. Bossi A, Battistini F, Braggion C, Magno EC, Cosimi A, de Candussio G., Gagliardini R, Giglio L, Giunta A, Grzincich GL, La Rosa M, Lombardo M, Lucidi V, Manca A, Mastella G, Moretti P, Pardo F, Quattrucci S, Raia V, Romano L, Salvatore D, Taccetti G, Zanda M. Italian Cystic Fibrosis Registry: 10 years of activity. *Epidemiol Prev* 1999; 23(1):5-16.
 25. Bossi A, Casazza G, Padoan R, Milani S. What is the incidence of cystic fibrosis in Italy? Data from the Nacional Registry (1988-2001). *Hum Biol* 2004; 76(3):455-67.
 26. Kollberg H. Incidence and survival curves of cystic fibrosis in Sweden. *Acta Paediatr Scand* 1982;71(2):197-202.
 27. Dodge JA, Morison S, Lewis PA, Coles EC, Geddes D, Russel G, Littlewood JM, Scout MT. Incidence, population, and survival of cystic fibrosis in the UK, 1968-95. *Arch Dis Child* 1997; 77(6):493-6.
 28. Kosorok MR, Wei WH, Farell PM. The incidence of cystic fibrosis. *Stat Med* 1996; 15:449-62.
 29. Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek Jr M, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 1998; 132:255-9.
 30. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of Cystic Fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24:544-7.
 31. Raskin S, Phillips III JA, Krishnamani MRS. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993;46: 665-9.
 32. Rodrigues R, Gabetta CS, Pedro KP, Valdetaro F, Fernandes MIM, Magalhães PKR, Januário JN, Maciel LMZ. Cystic fibrosis and neonatal screening. *Cad Saúde Publica, Rio de Janeiro* 2008; 24 Sup 4:S475-84.
 33. Santos GP, Domingos MT, Witting EO, Riedi CA, Rosario NA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81:240-4.
 34. Honório LFO, Ludwig Neto N, Barbosa E, Perin N, Gastaldi LA, Ferreira JE et al. Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina. *J Brás Pneumol* 2006; 32 (1Suppl):1-16.
 35. Reis F, Melo SO, Vergara AA. Programa de triagem neonatal para fibrose cística de Minas Gerais (PETN-FIBROSE CÍSTICA): aspectos clínicos e laboratoriais. *J Bras Pneumol* 2006; 32(1Suppl):1-16.
 36. Rodrigues R. Estudo piloto para a implantação da triagem da fibrose cística no Estado de São Paulo [Tese de Mestrado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2008.
 37. Correia CAA. Prevalência de seis mutações no gene *CFTR* em portadores de fibrose cística da região de Campinas [Dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
 38. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular Targeting of CFTR as a Therapeutic Approach to Cystic Fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 334-41.
 39. Suarez-Kurtz G. Pharmacogenomics in admixed populations. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(4):196-201.
 40. Cystic Fibrosis Mutation Database [Acesso em: 13 jun. 2011] Disponível em: URL:<http://www.geneticskids.on.ca>.
 41. Zielenski J, Tsui L-P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. *Annu Rev Gen* 1995; 29: 777-807.
 42. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis. *J Biol Chem.* 1999; 274(31):21873-7.

43. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-4.
44. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J of Med Genet* 2002; 111: 88-95.
45. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Resp Cell Biol* 2002; 27: 619- 27.
46. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutation. *Annals of Hum Genet* 2003; 67: 471-85.
47. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447(7140):87-91.
48. Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galiotta LJV, Verkman AS. Small-molecule correctors of defective deltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 2005; 115: 2564- 71.
49. Moran O, Zegarra-Moran O. A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein. *Febs Lett* 2005; 579:3979-83.
50. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Tummler B. Categories of Δ F508 homozygous Cystic Fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotype characteristics. *Twin Res* 2000;3(4):277-93.
51. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1214:57-69.
52. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-5.
53. Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 701- 18.
54. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J-J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibrosis* 2002; 1: 13-29.
55. Jilling T, Kirk KL. The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int Rev Cytol* 1997; 172: 193-241.
56. Bradbury NA, Clark JA, Watkins SC, Widnell CC, Smith HS 4th, Bridges RJ. Characterization of the internalization pathway for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol* 1999; 276: L659-68.
57. Prince LS, Peter K, Hatton SR, Zaliauskiene L, Cotlin LF, Clancy JP, Marchase RB, Collawn JF. Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem* 1999; 274:3602-9.
58. Weixel KM, Bradbury NA. The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem* 2000; 275(5):3655-60.
59. Prince LS, Workman RB, Marchase RB. Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:5192-6.
60. Carson MR, Travis SM, Welsh MJ. The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 1995; 270(4):1711-7.
61. Travis SM, Berger HA, Welsh MJ. Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:11055-60.
62. Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol* 1998; 274:C1397-410.
63. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009; 373:1891-904.
64. Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr (Rio J)* 2002; 78 (supl. 2):S171-86.

65. Harris R, Norman AP, Payne WW. The effect of pancreatin therapy on fat absorption and nitrogen retention in children with fibrocystic disease of the pancreas. *Arch Dis Child* 1955; 30(153):424-42.
66. Ferrone M, Raimondo M, Scolapio JS. Pancreatic enzyme pharmacotherapy. *Pharmacotherapy* 2007; 27(6):910-20.
67. Kreindler JL. Cystic fibrosis: Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther* 2010; 125(2):219-29.
68. Rowe SM, Miller SE, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352(19):1992-2001.
69. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290(13):1749-56.
70. Devlin TM. *Manual de bioquímica com correlação clínica*, 4ª ed. São Paulo, SP: Ed. Edgar Blucher LTDA, 1998.
71. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Annual Patient Registry Report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2009.
72. Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* 1991; 46(12):881-5.
73. Tuchman LK, Schwartz LA, Sawicki GS, Britto MT. Cystic Fibrosis and Transition to Adult Medical Care. *Pediatrics* 2010; 125:566-73.
74. Dobbin CJ, Bye PTP. Adults with cystic fibrosis: meeting the challenge! *Intern Med J* 2003; 33(12):593-7.
75. Konstan MW, Wagener JS, VanDevanter DR. Characterizing aggressiveness and predicting future progression of CF lung disease. *J Cyst Fibros* 2009; 8(suppl 1):S15-9.
76. Morrisay BM, Schock BC, Marelich P, Cross CE. Cystic Fibrosis in Adults. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 25:275-87.
77. Dentini P. *Complexo Burkholderia cepacia em pacientes com fibrose cística em um Centro de Referência no Brasil: identificação, prevalência e importância clínica* [Tese de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2010.
78. Shwachman H, Kulczycki LL. Long term study of one hundred five patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1958; 96:06-15.
79. Helbich TH, Heins-Perr G, Eichler I, Wunderbaldinger P, Wojnarowski C, Brach RC, Herold JC. Cystic fibrosis: CT assessment of lung involvement in children and adults. *Radiol* 1999; 213:537-44.
80. Barth L. *Perfil microbiológico e indicadores de gravidade em pacientes com fibrose cística* [Tese de Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
81. Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, McCauley DI et al. Cystic fibrosis: scoring system with thin-section CT. *Radiology* 1991; 179:783-8.
82. Nickerson BG, Lemen RJ, Gerdes CB, Wegmann MJ, Robertson G. Within-subject variability and percent change for significance of spirometry in normal subjects and in patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1980; 122:859-66.
83. Cooper C, Robertson C, Hudson I, Phelan P. Variability of pulmonary function tests in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1990; 8:16-22.
84. Robinson W, Waltz DA. FEV1 as a guide to lung transplant referral in young patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30:198-202.
85. Schaedel C, Monestrol I, Hjelt L, Johannesson M, Kornfalt R, Strandvik B, Wahlgren L, Holmberg L. Predictors of deterioration of lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 33: 438-91.
86. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: a Review. *Hum Mutation* 2001; 17: 439-74.
87. Ravnik-Glavac M, Atkinson A, Glavac D, Dean M. DHPLC Screening of Cystic Fibrosis Gene Mutations. *Hum mutation* 2002; 19: 374-83.
88. Paracchini, V.; Seia, M.; Coviello, D.; Porcaro, L.; Constantino, L.; Capasso, P.; DeGiorgio, D.; Padoan, R.; Corbetta, C.; Claut, T.; Constantini, D.; Colombo, C. Molecular and clinical

- features associated with CFTR gene rearrangements in Italian population: identification of a new duplication and recurrent deletions. *Clin Genet* 2008; 73: 346-52.
89. Description version 06 [Acesso em: 29 mai. 2011] Disponível em: URL:<http://www.mlpa.com>.
 90. Costantino L, Claut L, Paracchini V, Coviello DA, Colombo C, Porcaro L, Capasso P, Zanardelli M, Pizzamiglio G, Degiorgio D, Seia M. A novel donor splice site characterized by CFTR mRNA analysis induces a new pseudo-exon in CF patients. *J Cyst Fib* 2010; 9: 411-18.
 91. Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K. Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnostic of cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2004; 3: 165-9.
 92. Kunzelmann K, Mall M. Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 857-67.
 93. Hug M. Transepithelial measurements using the Ussing chamber. 2002. Disponível em: The European Working Group on CFTR Expression. [acesso em 23 de abr. 2010].
 94. Karczeski B, Cutting G. Diagnosis of cystic fibrosis, CFTR-related disease and screening. *Prog Respir Res* 2006; 34:69-76.
 95. Farrel PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr* 2008; 153:S4-14.
 96. Kerem E, Corey M, Kerem B-S, Durie P, Tsui LC, Levison H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *J Pediatr* 1989; 114:767-73.
 97. Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 537-46.
 98. Wilschanski M, Durie P. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* 2007; 56(8):1153-63.
 99. Efrati O, Nir J, Cohen-Cymbarknoh M, Shoseyov D, Vilozni D, Modan-Moses D, Levy R, Szeinberg A, Kerem E, Rivlin J. Meconium ileus in patients with cystic fibrosis is not a risk factor for clinical deterioration and survival: the Israeli Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50(2):173-8.
 100. Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, Algire M, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Fallin MD, West K, Arking DE, Chakravarti A, Cutler DJ, Cutting GR. Relative contribution of genetic and non-genetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. *Gastroent* 2006; 131(4):1030-39.
 101. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50:1178-84.
 102. Elder DA, Wooldridge JL, Dolan LM, D'Alessio DA. Glucose tolerance, insulin secretion, and insulin sensitivity in children and adolescents with cystic fibrosis and no prior history of diabetes. *J Pediatr* 2007; 151:653-8.
 103. Paccou J, Zeboulon N, Combescure C, Gossec L, Cortet B. The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review. *Calcif Tissue Int* 2010; 86(1):1-7.
 104. Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1996; 335:179-88.
 105. Andrade EF, Fonseca DLO, Silva FAA, Menna-Barreto SS. Avaliação evolutiva da espirometria na fibrose cística. *J Pneumol* 2001;27(3):130-6.
 106. Lemos ACM, Matos, E, Franco R, Santana P, Santana MA. Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. *J Bras Pneumol* 2004;30(1):9-13.
 107. Radpour R, Gilani MAS, Gourabi H, Dizaj AV, Mollamohamadi S. Molecular analysis of the IVS8-T splice variant 5T and M470V exon 10 missense polymorphism in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(7):469-73.

108. Duguépéroux I, De Braekeleer M. The CFTR 3849+10Kb C>T and 2789+5G>A alleles are associated with a mild CF phenotype. *Eur Respir J* 2005; 25:468-73.
109. Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, Mastella G, Navarro J, Strandvik B, McKenzie S. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutation. *Pediatr Pulmonol* 2001; 31(1):1-12.
110. Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJ, Konstan MW, Hunter J, Berclaz PY, Brass L, Zeitlin PL, Hammond K, Davies Z, Foy C, Noone PG, Knowles MR. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: an outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatric Pulmonol* 2004; 37: 385-392.
111. Sermet-Gaudelus I, Dechaux M, VAllee B, Fajac A, Girodon E, Nguyen-Khoa T, Marianovski R, Hurbain I, Bresson JL, Lenoir G, Elderman A. Chloride transport in nasal ciliated cells of cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:1026-31.
112. Stanke F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Gallati S, Laabs U, Derichs N, Ritzka M, Posselt H-G, Harms HK, Griesse M, Blau H, Mastella G, Bijman J, Veeze H, Tummler B. Diversity of the basic defect of homozygous CFTR mutation genotypes in humans. *J Med Genet* 2008; 45:47-54.
113. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lpes A-I, Barreto C, Ramalho A, Amaral M, Kunzelmann K, Mall M. CFTR Cl-Channel Function in Native Human Colon Correlates with the Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127:1085-95.
114. Ho LP, Samways JM, Porteous DJ, Dorin JR, Carothers A, Greening AP, Innes JA. Correlation between nasal potential difference measurements, genotype and clinical condition in patients with cystic fibrosis. *Eur Resp Journal* 1997; 10: 2018-22.
115. Walker LC, Venglarik CJ, Aubin G, Weatherly MR, McCarty NA, Lesnick B, Ruiz F, Clancy JP, Sorsche EJ. Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 155: 1684-89.
116. Wallace HL, Barker PM, Southern KW. Nasal Airway Ion Transport and Lung Function in Young People with Cystic Fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2003; 168:594-600.
117. Jézéquel P, Dubourg C, Le Lannou D, Odent S, Le Gall J-Y, Blayau M, Le Treut A, David V. Molecular screening of the CFTR gene in men with anomalies of the vas deferens: identification of three novel mutations.
118. Burgel P-R, Fajac I, Hubert D, Grenet D, Stremier N, Roussey M, Siret D, Languépin J, Mely L, Fanton A, Labbé A, Domblides P, Vic P, Dagorne M, Reynaud-Gaubert M, Counil F, Varaigne F, Bienvenu T, Bellis G, Dusser D. Non-classic cystic fibrosis associated with D1152H CFTR mutation. *Clin Genet* 2010; 77:355-64.
119. Farinha CM, Amaral MD. Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an Early Folding Checkpoint and independently of Calnexin. *Mol Cell Biol* 2005; 25(12):5242-52.
120. Yang H, Shelat AA, Guy RK, Gopinath VS, Ma T, Du K, Lukacs GL, Taddei A, Folli C, Pedemonte N, Galiotta LJ, Verkman AS. Nanomolar affinity small molecule correctors of defective F508-CFTR chloride channel gating. *J Biol Chem* 2003; 278:35079-85.
121. Beck S, Penque D, Garcia S, Gomes A, Farinha C, Mata L, Gulbenkian S, Gil-Ferreira K, Duarte A, Pacheco P, Barreto C, Lopes B, Cavaco J, Lavinha J, Amaral MD. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G mutation have mild disease, leaky alternative m RNA Splicing, and CFTR Protein at the cell membrane. *Hum Mut* 1999; 14:133-44.
122. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, et al. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr* 1995; 127(5):705-10.
123. Cemlyn-Jones J, Gamboa F. Proteinuria in cystic fibrosis: a possible correlation between genotype and renal phenotype. *J Bras Pneumol* 2009; 35:669-75.
124. Xiong X, Bragin A, Widdicombe JH, Cohn J, Skach WR. Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* 1997; 100(5):1079-1088.

125. Chalkley G, Harris A. A cystic fibrosis patient who is homozygous for the G85E mutation has very mild disease. *J Med Genet* 1991; 28:875-7.
126. Vazquez C, Antinolo G, Casals T, Dapena J, Elorz J, Seculi JL, Sirvent J, Cabanas R, Soler C, Estivill X. Thirteen cystic fibrosis patients, 12 compound heterozygous and one homozygous for the missense mutation G85E: a pancreatic sufficiency/insufficiency mutation with variable clinical presentation. *J Med Genet* 1996; 33:820-2.
127. Vankeerberghen A, Wei L, Jaspers M, Cassiman J-J, Nilius B, Cuppens H. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet* 1998; 7(11):1761-9.
128. Pasyk EA, Morin XK, Zeman P, Garami E, Galley K, Huan LJ, Wang Y, Bear CE. A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. *J Biol Chem* 1998; 273(48):31759-64.
129. Wang S, Raab RW, Shatz PJ, Guggino WB, Li M. Peptide binding consensus of NHE-RF-PZD1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 1998; 427:103-8.
130. Mussafi H, Prais D, Mei-Zahav M, Blau H. Cystic fibrosis mutations with widely variable phenotype. *Pediatric Pneumonol* 2006; 41:250-4.

Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 18/07/11
(Grupo III)

3ª VIA

PARECER CEP: N° 503/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0386.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE REGULADOR (CFTR- CANAL DE CLORO) EM BIÓPSIAS RETAIS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Antonio Fernando Ribeiro

INSTITUIÇÃO: Departamento de Pediatria e Genética Médica / FCM / UNICAMP.

APRESENTAÇÃO AO CEP: 19/07/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/07/08 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Promover o envolvimento multidisciplinar a fim de se entender os mecanismos da Fibrose Cística para que se possa desenvolver e testar novas terapias direcionadas para mutações específicas da doença.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto de pesquisa em genética humana, com cooperação estrangeira e com menores de 18 anos. Através de uma parceria entre a Unicamp e a Universidade de Lisboa pretende-se implantar na Unicamp a utilização da micro-câmara de Ussing para estudos de eletrofisiologia em pacientes brasileiros com Fibrose Cística. O treinamento de recursos humanos será feito em Lisboa e o grupo português viria ao Brasil para trazer o equipamento para a realização dos testes. Estes serão detecção molecular em amostra de sangue periférico, de análise de expressão de RNAm de células epiteliais nasais e por biópsia de mucosa retal para estudos eletrofisiológicos. Todos os resultados serão entregues aos pacientes que receberão também aconselhamento genético. Serão 30 sujeitos de pesquisa com HD de Fibrose Cística que ainda não tenham o diagnóstico de confirmação. Os critérios de inclusão estão definidos e se autorizado material biológico será armazenado no Banco do Laboratório de Genética Molecular. Não haverá nenhum ressarcimento aos pacientes.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O pesquisador se compromete a seguir os regulamentos para utilização desses dados. O projeto tem método, objetivos coerentes e adequado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6133
13064-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de julho de 2007.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2

1. Coletar o sangue em tubos contendo EDTA (7-10mL).
2. Centrifugar o sangue por 10min a 2500rpm e descartar o plasma.
3. Transferir os leucócitos (aproximadamente 4mL) para um tubo falcon. Adicionar tampão RSB 1x até completar o volume final de 11mL no tubo. Homogeneizar por 10min.
4. Adicionar 6 gotas de nonidet P40. Homogeneizar por 10min.
5. Centrifugar por 10min a 2500rpm e desprezar o sobrenadante.
6. Ressuspender o pellet em 500 μ L de tampão RSB 1x.
7. Lisar os núcleos com 3mL de SDS e misturar por inversão repetidamente.
8. Adicionar 80 μ L de proteinase K. A concentração final deve ser de 100 μ g/mL.
9. Incubar por 2-3h ou overnight a 37°C.
10. Adicionar 3mL de fenol saturado. Misturar, invertendo o tubo gentilmente, e homogeneizar por 10min. Centrifugar por 10min a 2500rpm.
11. Remover a porção superior do tubo (transparente) com uma pipeta Pasteur para outro tubo falcon. Tomar cuidado para não agitar a porção inferior, a qual foi descartada.
12. Adicionar 1,5mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 1,5mL de fenol saturado. Homogeneizar por 10min e centrifugar por 10min, 2500rpm. Remover a porção inferior do tubo (fenol) com pipeta Pasteur e descartar.
13. Adicionar 3mL de clorofórmio:álcool (24:1) isoamílico, misturar a solução e homogeneizar por 10min. Centrifugar a 2500rpm por 10min. Remover completamente a porção inferior do tubo e descartar.
14. Adicionar 6mL de etanol 100% gelado e misturar levemente, até observar a precipitação do DNA.
15. Retirar o DNA precipitado com auxílio de pipeta Pasteur de vidro e ressuspendê-lo em 200-250 μ L de TE 1X.