

LEONARDO VICENTINI ARRUDA

**INCIDÊNCIA DA FIBROSE CÍSTICA CALCULADA
ATRAVÉS DE PORTADORES DO ALELO Δ F508 NO
NORDESTE E SUDESTE DO BRASIL**

CAMPINAS

2007

LEONARDO VICENTINI ARRUDA

**INCIDÊNCIA DA FIBROSE CÍSTICA CALCULADA
ATRAVÉS DE PORTADORES DO ALELO $\Delta F508$ NO
NORDESTE E SUDESTE DO BRASIL**

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

ORIENTADORA: PROF^a DR^a CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2007

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

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

Ar69i Arruda, Leonardo Vicentini
Incidência da fibrose cística calculada através de portadores do
alelo $\Delta F508$ no Nordeste e Sudeste do Brasil /Leonardo Vicentini
Arruda. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Mutação. 2. Incidência. 3. População - Brasil. 4. Fibrose
cística. 5. Regulador de condutância transmembrana em fibrose
cística. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Cystic fibrosis incidence calculated from heterozygote
frequencies in Northeast and Southeast Brazil**

Keywords: • Mutation
• Incidence
• Brazil, population
• Cystic fibrosis
• CFTR

Titulação: Mestre em Farmacologia

**Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro
Profa. Dra. Ester Silveira Ramos**

Data da defesa: 14 - 08 - 2007



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo

Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Three handwritten signatures are present to the right of the member names. The top signature is for Carmen Silvia Bertuzzo, the middle one for José Dirceu Ribeiro, and the bottom one for Ester Silveira Ramos. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

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

Data: 14/08/2007

DEDICATÓRIA

*A Elaine, minha esposa, por todo seu amor.
e por incentivar-me constantemente
na realização dos nossos sonhos...*

*Aos meus pais, Leandro e Margarida, pelo
amor, exemplo, educação e caráter
exemplar que ainda me transmitem*

À Profa Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, minha amiga e orientadora. Por ter acreditado na possibilidade da realização deste trabalho. Sua orientação ética é uma lição a ser espelhada. Muito obrigado...

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, exemplo de competência e pelo grande apoio em todos os momentos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade de seu precioso tempo.

Ao Dr. Léo Roberto Barth, por me co-orientar em meu primeiro trabalho científico.

À Cyntia e Luciana pelos conselhos e preciosas broncas durante nossa convivência.

Ao Rodrigo Secolin e ao Fábio, pela amizade e ajuda na solução dos problemas cotidianos.

À companheira Marilza pela lição de vida.

Às gêmeas Isabel e Elisângela, ao Rafael e Lili pela ajuda na extração de infindas amostras.

Às Dras. Ana Segall e Denise Pontes Cavalcanti por permitirem que eu utilizasse as amostras deste estudo.

Aos pacientes, pais, e a toda equipe que os acompanham no ambulatório de fibrose cística.

Aos amigos William Roberto e Fabrício Santos, pela amizade e companheirismo.

À Roberta por ter me dado a oportunidade de fazer o que gosto.

Ao Prof. José Carlos Geraldo pelos mais profundos ensinamentos sobre os valores da vida.

A todos outros não citados que tiveram participação direta ou indireta na conclusão deste trabalho

As voluntárias participantes deste estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

	PÁG.
RESUMO	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xviii</i>
1- INTRODUÇÃO	21
1.1- Histórico da doença	22
1.2- Epidemiologia	23
1.3- Manifestações clínicas	28
1.3.1- Manifestações pulmonares.....	28
1.3.2- Manifestações gastro intestinais.....	31
1.3.3- Infertilidade.....	33
1.3.4- Outras afecções.....	34
1.4- Fisiopatologia	38
1.5- Genética	38
1.5.1- Heterogeneidade.....	41
1.5.2- Genética populacional.....	43
1.5.3- Evolução.....	51
1.5.4- FC na população brasileira.....	52
2- OBJETIVOS	54
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
3.1- Casuística	57
3.2- Caracterização da amostra	57
3.3- Método molecular	58

3.3.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico.....	58
3.3.2- Investigação da mutação $\Delta F508$	59
3.4- Cálculo de intervalo de confiança.....	61
3.5- Caracterização dos pacientes.....	61
3.6- Tipo de estudo.....	61
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1- Cálculo da incidência da fibrose cística.....	64
5- CONCLUSÕES.....	68
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7- ANEXOS.....	82
Anexo 1.....	83
Anexo 2.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

ACBVD	“Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens” – Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CFTR	“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator” – Proteína Transmembrana Reguladora da Condutância iônica
DUN	Domínio de união do nucleotídeo “NBD - nucleotide binding domais”
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IC	Intervalo de confiança
FC	Fibrose Cística
Kb	Quilobases
Kda	QuiloDaltons
LEM	Sítio de ligação e empacotamento da manose “MBL - manose binding lectin”
PCR	“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de bases
QV	Qualidade de vida
RNA	Ácido ribonucléico
SSCP	“Single-Strand Conformation Polymorphism” Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples
T	Timidina
r. p. m.	Rotações por minuto

	PÁG.
Tabela 1- Incidência da FC e distribuição geográfica da mutação $\Delta F508$ em populações européias.....	24
Tabela 2- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos.....	25
Tabela 3- Incidência de Fibrose Cística em países da América Latina, e sua distribuição entre os gêneros.....	26
Tabela 4- Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros.....	27
Tabela 5- Distribuição geográfica da mutação $\Delta F508$ entre pacientes em diversos países.....	48
Tabela 6- Percentual da população residente por grupo étnico nos municípios de Campinas e João Pessoa.....	64

	PÁG.
Figura 1- Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão.....	29
Figura 2- Caracterização do gene CFTR humano e seu transcrito.....	40
Figura 3- As diferentes classes de mutação na proteína CFTR.....	42
Figura 4- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR.....	44
Figura 5- Distribuição geográfica da mutação $\Delta F508$ em países e regiões da Europa.....	47
Figura 6- Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%.....	60

LISTA DE QUADROS

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Espectro das manifestações clínicas em pacientes com FC.....	37

RESUMO

A incidência da fibrose cística no Brasil é significativamente variável, com diferenças de até 20 vezes de acordo com o grupo étnico e região geográfica estudada. A população brasileira é composta da mistura de muitos grupos étnicos. Os portugueses começaram a colonização no século XVI. Os holandeses invadiram o nordeste em 1630. Os africanos foram trazidos ao Brasil, numa contínua migração forçada, que perdurou do século XVI ao século XIX. No final do século XIX, tiveram início novos movimentos migratórios, principalmente da Alemanha, Itália, Arábia e Espanha. Durante as três primeiras décadas do século XX, nova corrente migratória ocorreu, principalmente da Itália, Espanha e Portugal. Após a segunda guerra mundial, o Brasil recebeu novos imigrantes (japoneses, judeus) compondo esta população.

Este estudo gerou os primeiros dados sobre a incidência da FC no nordeste e também foram obtidos novos dados para a região sudeste.

Na época do estudo, na cidade de Campinas estão sob atendimento no ambulatório 70 pacientes não aparentados com dois testes de suor alterados. Nestes pacientes, foram triadas as seguintes mutações. $\Delta F508$ (50%), G542X (4,29%), R1162X (2,14%), N1303K (1,43%) e R553X (0,71%). A mutação G551D não foi encontrada.

A mutação $\Delta F508$ também foi analisada em 1.138 mulheres saudáveis, sendo 694 da cidade de Campinas - SP e 444 de João Pessoa – PB com idade média de 26,3 anos (15-39, $\pm 6,8$), que participaram voluntariamente de projeto de pesquisa anterior.

Nas amostras coletadas em Campinas $n=694$ não foi encontrado nenhum alelo mutante 0/1.388, o que nos impediu de calcular a incidência nesta cidade através deste método.

Dos 888 alelos analisados de João Pessoa, foram encontrados quatro alelos mutantes ($p=0,0045$). Sabendo que a mutação $\Delta F508$ corresponde a aproximadamente 50% dos alelos de indivíduos com FC no Brasil, a frequência dos alelos causadores da FC foi estimada utilizando a proporção: $(0,0045/0,5)=0,0090$. Com isso, para a cidade de João Pessoa a incidência estimada desta doença autossômica recessiva é de 1:12.321 indivíduos. Esta incidência é similar à encontrada por afro-brasileiros, entretanto difere por exemplo, da encontrada na população do RS.

Quando utilizamos o método de cruzamento de dados étnicos das duas regiões estudadas com dados literários da doença nos diferentes grupos étnicos, na cidade de Campinas a incidência da FC ficaria em 1/4.434 e na cidade de João Pessoa ficaria 1/6.087.

ABSTRACT

Cystic fibrosis incidence calculated from heterozygote frequencies in Northeast and Southeast Brazil

The incidence of the Cystic Fibrosis (CF) is significantly variable in Brazil, with differences larger than 20 fold, according with the ethnic group and geographic studied region. Brazilian population is composed by ethnic admixture. Portuguese started colonization in the 16th century. The Netherlander invaded the northeast in 1630. The Africans were brought to Brazil, in a continuous forced migration, which lasted from 16th to 19th centuries. In the 19th century, new migratory movements have begun from Germany, Italy, Arab and Spain. In the first three decades of the 20th century, started a new migratory flow, mainly from Italy, Spain and Portugal. After the World War II, Brazil received additional immigrants (Japanese, Jewish) compounding its population.

These studies generated the first data about the CF incidence on the Brazilian northeast and also were obtained new data about the southeast region.

At the time of this study, 70 non related patients were attended at the local CF center in Campinas, with two positive sweat tests in the city of Campinas-SP. On theses patients were screened the following mutations: $\Delta F508$ (50%), G542X (4.29%), R1162X (2.14%), N1303K (1.43%) and R553X (0.71%). The mutation G551D wasn't found.

The $\Delta F508$ mutation was also analyzed in 1,138 healthy voluntary women, 694 from Campinas – SP and 444 from João Pessoa – PB, with average age of 26.3 years (15-39, ± 6.8), who previously participated from another research.

In the samples collected in Campinas – SP $n=694$ wasn't found any mutated allele 0/1,388 and so, we wasn't able to make any incidence calculation through this method.

In the 888 alleles from João Pessoa, four carry the $\Delta F508$ mutation ($p=0.0045$). Knowing that this mutation accounts for approximately 50% of the FC patients alleles in Brazil, the incidence of the CF in this region was estimated using the proportion: $(0.0045/0.5)=0.009$. Thus, the estimated incidence of this recessive disease in João Pessoa was 1:12,321. This incidence is similar to the found in African-Brazilians, although differs for example, to the found on the RS population.

When we use the method of crossing ethnic data of both studied regions with literary data of the disease in the different ethnic groups, in the city of Campinas, the incidence of the CF would be in 1/4,434 and in the city of João Pessoa would be 1/6,087.

1- INTRODUÇÃO

Anteriormente descrita como fibrose cística do pâncreas, esta doença têm sido rotulada simplesmente como fibrose cística (FC). A FC ou Mucoviscidose é a doença genética mais encontrada em caucasóides afetando um em cada 2.500 nascimentos, sendo rara em negros e asiáticos. A incidência desta doença varia conforme a população estudada, inclusive dentro de um mesmo grupo étnico (FitzSimmons, 1993).

O gene responsável por esta doença, localiza-se no braço longo do cromossomo 7, na região 31.2, onde codifica a proteína transmembrana reguladora da condutância iônica (CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), que possui 1480 aminoácidos apresentando aproximadamente 168KDa. Mutações no gene da CFTR estão relacionadas com a causa da FC e Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (ACBVD) devido à produção de uma proteína anômala, resultando em fluxo de condução de íons defeituoso na membrana plasmática das células epiteliais.

A expressão clínica da FC é heterogênea, caracterizada pelo transporte defeituoso de cloretos nas células exócrinas dos pulmões, pâncreas e glândulas sudoríparas, resultando em uma insuficiência pulmonar e pancreática crônicas, assim como aumento da concentração de cloretos no suor. A expressão clínica da ACBVD é a infertilidade masculina, que poderá ocorrer isoladamente ou ser mais uma manifestação da FC.

Já foram publicados milhares de trabalhos sobre a FC, porém a cura definitiva ainda não está disponível e a FC continua a causar quantidade muito significativa de óbitos, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

1.1- Histórico da doença

“Pobre niño aquél al que al besarle su frente sabe a sal, un embrujo pesa sobre él y no tardará en morir”¹. Esta frase, retirada do antigo folclore europeu, já demonstrava o reconhecimento de doença fatal que acometia crianças e que se caracterizava pelo sabor excessivamente salgado do suor.

¹ “Pobre criança aquela que ao ser beijada na testa apresentar um gosto salgado, uma praga lhe pesa e não tardará em morrer”

No final do século XIX, surgiram os primeiros relatos sobre esta doença na literatura alemã. Em 1936, a primeira descrição de síndrome celíaca com alterações pancreáticas diferentes da doença celíaca típica foi descrita (Fanconi et al., 1936). Em 1938, Dorothy Andersen realizou completa descrição anátomo-patológica da enfermidade, denominando-a doença fibrocística do pâncreas (Andersen, 1938).

Em 1944, criou-se o termo mucoviscidose, propondo hipótese de que o muco espesso era responsável pelos quadros pulmonares e pancreáticos. (Farber et al., 1945).

Lowe et al. (1949) descreveram minuciosamente o padrão de herança autossômico recessivo da FC.

Em 1951, observou-se o elevado teor de cloreto de sódio no suor de pacientes com Fibrose Cística, o que foi passo essencial para o diagnóstico (Di Sant'Agnese et al., 1953). Posteriormente a técnica para diagnóstico foi padronizada com coleta do suor estimulado, que ainda hoje é considerado o padrão ouro para diagnóstico. (Gibson e Cook, 1959).

1.2- Epidemiologia

A Fibrose Cística é a doença genética mais encontrada em populações européias (Tabela 1). Afeta um em 2.500 nascimentos vivos, com frequência de heterozigotos de aproximadamente um em 23, sendo rara em negros e asiáticos (Tabela 2). Possui padrão de herança autossômico recessivo e a incidência desta doença varia conforme a população estudada, inclusive dentro do mesmo grupo étnico. (Welsh et al., 1995; Jorde et al., 2000).

Tabela 1- Incidência da FC e distribuição geográfica da mutação $\Delta F508$ em populações europeias (Lucotte et al., 1995)

País	Incidência	<i>f</i> ($\Delta F 508$)
Irlanda	1 : 1.800	0,54 – 0,68
Inglaterra	1 : 2.400	0,70 – 0,82
Itália	1 : 2.500	0,33 – 0,61
República Checa	1 : 2.600	0,58 – 0,68
França	1 : 2.900	0,63 – 0,81
Alemanha	1 : 3.300	0,60 – 0,80
Espanha	1 : 3.500	0,50 – 0,87
Grécia	1 : 3.500	0,55
Holanda	1 : 3.700	0,75 – 0,79
Bélgica	1 : 3.700	0,71 – 0,80
Noruega	1 : 4.500	0,60
Dinamarca	1 : 4.700	0,87 – 1
Rússia	1 : 4.900	0,44 – 0,62
Polónia	1 : 6.000	0,47 – 0,53
Suíça	1 : 7.700	0,63
Suécia	1 : 8.000	0,67
Finlândia	1 : 25.000	0,45

Tabela 2- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos (FitzSimmons, 1993)

Região Étnica	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 Havai	1 : 90.000

Verificando o número total de nascimentos de crianças caucasóides em Ohio durante os anos 1950 a 1953, Steinberg e Brown² (1960) estimaram a frequência fenotípica em aproximadamente um em 3.750, valor pouco mais baixo do que a de estimativas mais recentes. A FC mesmo nesta estimativa mais baixa é a doença genética fatal mais prevalente na infância. A frequência do gene foi estimada para ser aproximadamente 0,0163, e 3% dos caucasóides são heterozigotos.

Bois et al. (1978) relataram frequência mínima de um em 377 nascimentos em Brittany, uma área da França. Scotet et al. (2002) retrospectivamente analisaram todos os 520 pacientes com FC nascidos em Brittany desde 1960. O local do nascimento dos pacientes, o espectro de mutações da CFTR, e a distribuição espacial das mutações através de Brittany foram determinados. A incidência de FC foi de um em 2.630. Na época do estudo, a incidência de FC estava diminuindo, principalmente em consequência do diagnóstico pré-natal.

² Steinberg AG, Brown DC. On the incidence of cystic fibrosis of the pancreas. Am. J Hum Genet. 1960; 12:416-24 *apud* Wagener DK, Cavalli-Sforza LL .

Na América Latina, os primeiros dados epidemiológicos sobre a FC só foram obtidos a partir de 1990, com a criação do Registro Latino Americano de pacientes com Fibrose Cística. Os primeiros dados em 1992 demonstraram 1.342 pacientes registrados na América Latina. A taxa mediana de sobrevivência era de nove anos, ou seja, pior do que a dos EUA na década de 70. Em 1994, o número de pacientes registrados subiu para 1.588, porém com estimativa de representar menos de que 20% do total de pacientes.

A real situação da FC no Brasil ainda carece de estudos. Os estudos realizados sobre a incidência da doença neste país são restritos principalmente às regiões Sul e Sudeste e não podem refletir a realidade de todo o país, já que a população brasileira resulta de uma grande miscigenação de três grupos étnicos principais: o branco, o negro e o índio.

Macri et al. (1991) em estudo retrospectivo em 743 pacientes com FC, em quatro países da América Latina (Brasil, Chile, México e Argentina), não encontraram diferenças significativas na mediana de idade em que se fez o diagnóstico nos quatro países, que era de três anos. A idade mediana desses pacientes variou de três anos no Chile a onze anos na Argentina. A idade mediana de óbito variou de 3,1 anos no Chile a 8,7 na Argentina. Entre pacientes argentinos, 39,2% sobreviviam até os 10 anos de idade, e 18% até os 15 anos. No Brasil, Chile e México, a incidência da doença foi discretamente maior em indivíduos do gênero masculino, conforme exposto na Tabela 3.

Tabela 3- Incidência de Fibrose Cística em países da América Latina, e sua distribuição entre os gêneros (Macri et al., 1991)

País	Período*	N	Masculino	Feminino
Brasil	13 anos	59	36 (61%)	23 (39%)
Chile	10 anos	70	38 (54%)	32 (46%)
México	7 anos	200	112 (56%)	88 (44%)
Argentina	21 anos	414	193 (46%)	221 (54%)

(*) Intervalo de tempo em que se realizou o estudo.

Em estudo epidemiológico com 111 pacientes, realizado em Minas Gerais, Reis et al. (1998) encontraram idade mediana de sobrevida de 12,6 anos.

Alvarez et al. (2004) em estudo com pacientes fibrocísticos acompanhados na última década do século XX na UNICAMP, encontrou mediana de idade do óbito de sete anos e oito meses e a sobrevida mediana de 18 anos.

Raskin et al. (2007), em estudo que teve início em 1990, pesquisaram o genoma de 3.000 brasileiros recém-nascidos de cinco estados. Rio Grande do Sul/RS, Santa Catarina/SC, Paraná/PR, São Paulo/SP e Minas Gerais/MG. Os resultados permitiram estimar a frequência da doença nesses estados e foi surpreendente ao revelar que, em alguns deles, a doença pode ser tão frequente quanto em algumas populações européias. No RS, por exemplo, a estimativa da incidência da doença chega a 1:1.587, ou seja, tão frequente quanto na Europa ou EUA, (Tabela 4) de modo que neste estado, uma em cada 20 pessoas é heterozigota em relação a alguma mutação no gene da FC e em cada 400 casais de gaúchos, pelo menos em um, ambos são heterozigotos.

Tabela 4- Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros. (Raskin et al., 2007)

Estado / População	Incidência de homozigotos mutantes	Estimativa de portadores do gene da FC
RS / Euro-Brasileiros	1:1.587	1:20
PR	1:6.803	1:42
SC	1:12.195	1:56
Afro-Brasileiros	1:14.085	1:60
MG	1:21.227	1:73
SP	1:32.258	1:90
Total	1:7.576	1:44

Apesar dos dados brasileiros serem preocupantes, verificaram-se enormes avanços nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico precoce e tratamento adequado de indivíduos afetados, o que resultou em melhora nítida na taxa de sobrevida e qualidade de vida. Segundo informações da Associação Brasileira de Apoio a Mucoviscidose, atualmente, existem aproximadamente 1.500 pacientes sob tratamento no Brasil e nos EUA, a mediana de sobrevida é de 31 anos, 36% têm idade superior a 18 anos, dos quais 90% têm diploma de 2o grau. Aproximadamente 34% estão casados e 80% estão na escola ou empregados. Esses números contrariam a imagem clássica que a FC é fatal da infância.

1.3- Manifestações clínicas

A expressão clínica dos indivíduos com FC é heterogênea, caracterizada principalmente pelo transporte defeituoso de íons nas células exócrinas dos pulmões, pâncreas e glândulas sudoríparas resultando em insuficiência pulmonar e pancreática crônicas, assim como aumento da concentração de cloretos no suor. Em homens, poderá ocorrer também a Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (ACBVD) levando a infertilidade. (Jorde et al, 2000).

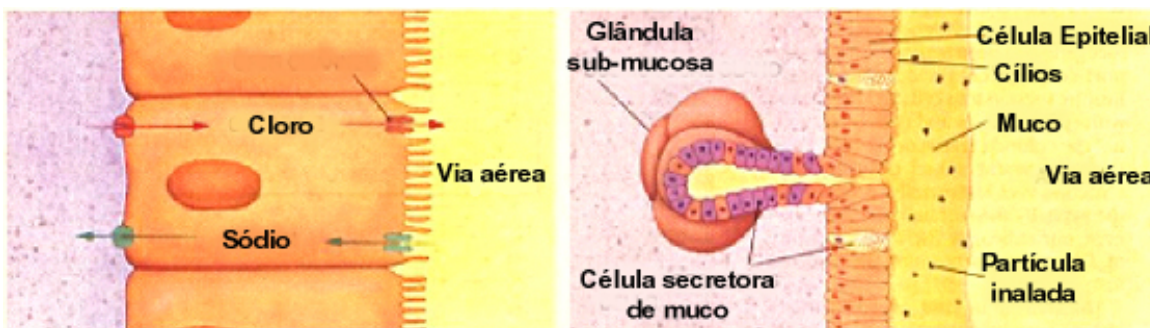
1.3.1- Manifestações pulmonares

Na FC, o envolvimento pulmonar é a maior causa de morbidade e mortalidade. Ao nascimento, as crianças com FC apresentam pulmões estruturalmente normais. Com o tempo, as sucessivas infecções e inflamações, culminam com hipertensão pulmonar e insuficiência respiratória crônica. Problemas no sistema respiratório ocorrem em mais de 90% dos indivíduos com FC, se apresentando de forma progressiva e de intensidade variável. Esta intensidade de acometimento é o que determina o prognóstico da doença (Bulitta et al., 2007).

Bactérias, vírus e fungos são os responsáveis pelas infecções pulmonares, sendo que as bactérias mais frequentemente isoladas em adultos são: *Pseudomonas aeruginosa* (83%), *Staphylococcus aureus* (60%) *Haemophilus influenzae* (68%). A fisiopatologia das infecções, sobretudo bacterianas em pacientes com FC, está relacionada a hiperviscosidade do muco, (Figura 1) associada à provável assimetria do movimento ciliar. Estes provocam acúmulo de muco nos dutos aéreos, começando pelos bronquíolos, progredindo em direção aos brônquios de maior calibre e obstruindo essas estruturas. Como consequência desse processo, o parênquima pulmonar fica comprometido, favorecendo a proliferação bacteriana no trato respiratório (Robinson, 2001).

A idade de aparecimento dos sintomas respiratórios é variável. Alguns pacientes os desenvolvem na adolescência; outros desenvolvem estes sintomas cedo, que depois remitem, retornando em idade avançada (McCormick et al., 2007).

Pulmão Normal



Pulmão Afetado

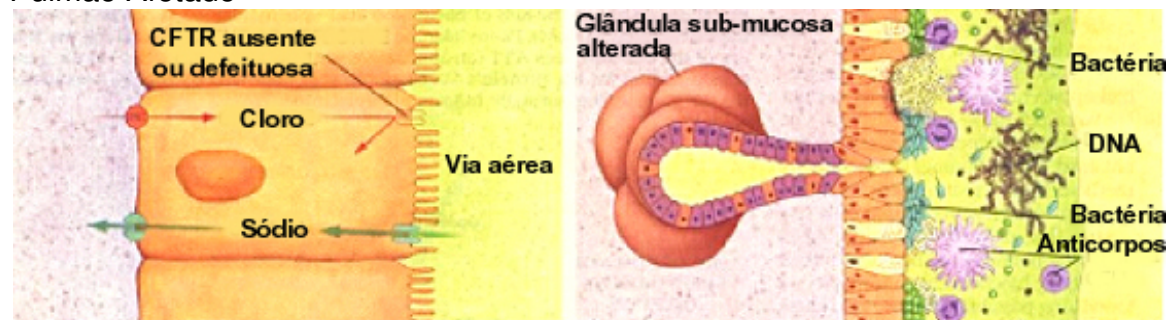


Figura 1- Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão (Adaptado de http://www.lclark.edu/~bkbaxter/200lecture/o_and_o/mar_23.htm)

O primeiro microorganismo a colonizar pacientes com FC é o *Staphylococcus aureus*, criando condições para futura colonização pela *P. aeruginosa*, que coloniza a maioria dos pacientes com FC antes dos 10 anos de idade. O organismo responde com inflamação e episódios de intensos problemas respiratórios. As cepas não mucóides ocorrem no início da colonização que ao tornar-se crônica, são substituídas pelas mucóides. A colonização por essa bactéria é uma das principais causas de doença pulmonar progressiva. O tratamento para a *P. aeruginosa*, se faz através de antibióticos, broncodilatadores, antiinflamatórios e fisioterapia. (Zuckerman e Seder, 2007).

Bactérias do gênero *Burkholderia* vêm se tornando grande preocupação para os médicos, e em alguns casos, ela leva a progressão muito rápida e fatal da doença conhecida como síndrome cepacia. Além deste fato, esta bactéria possui resistência natural a grande maioria dos antibióticos conhecidos. (St Denis et al., 2007).

Pier et al. (1996) propuseram explicação experimental para a susceptibilidade dos pacientes com FC a infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*. Eles encontraram que culturas de células epiteliais das vias aéreas de humanos expressando a mutação $\Delta F508$, do gene CFTR, são muito mais propensas a infecções por *Pseudomonas aeruginosa* quando comparadas com as formas selvagens dos alelos. Os autores concluíram que a CFTR deve contribuir normalmente com o mecanismo imune de auto defesa que é importante para o afastamento da *P. aeruginosa* no trato respiratório.

Garred et al. (1999) investigaram se os alelos variantes do sítio de ligação e empacotamento da manose (LEM), descritos por Madsen et al. (1994), que são fatores chave na imunidade inata e são diretamente associados com as infecções recorrentes, pudessem ser fatores de risco para pacientes com FC. Em 149 pacientes com FC, os diferentes genótipos da LEM foram comparados com a função pulmonar, infecção microbiológica, e aos índices de sobrevivência no estágio final da doença (morte ou transplante pulmonar). A função pulmonar foi reduzida significativamente nos portadores de alelos variantes da LEM, quando comparada com os homozigotos normais para estas variantes. O impacto negativo de alelos variantes na função pulmonar foi extremamente restrito nos pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*. A infecção por *Burkholderia cepacia* foi significativamente mais freqüente nos portadores de alelos variantes quando

comparada ao grupo dos homozigotos. O risco de morte no estágio final da doença nos pacientes com FC, entre portadores de alelos variantes é três vezes maior. O tempo de sobrevivência diminuiu acima de 10 anos a partir da contaminação. Além disso, usando análise modificada da tabela da vida, Garred et al. (1999) estimaram que a idade predita de sobrevivência foi oito anos menor em portadores do alelo variante, quando comparada com homozigotos normais.

1.3.2- Manifestações gastro intestinais

Juntamente com o sistema respiratório, o digestivo também é afetado pela FC, com manifestações variáveis. O muco pode obstruir o sistema digestivo e evitar que as enzimas pancreáticas alcancem o intestino. Deste modo, como descrito por Jorde (2000), 85% dos pacientes com FC possuem insuficiência pancreática. Quanto aos sinais gastrintestinais podem ocorrer esteatorréia, apetite voraz com síndrome de má-absorção, íleo meconial, prolapso retal e, freqüentemente, refluxo gastresofágico.

1.3.2.1- Insuficiência pancreática

Aproximadamente 15% dos pacientes com FC não apresentam insuficiência pancreática. Devotto et al. (1989) pesquisaram os haplótipos e a freqüência alélica de cinco marcadores polimórficos, próximos ao locus gênico responsável pela FC, em 355 pacientes com FC da Bélgica, Alemanha, Grécia e Itália. Eles foram divididos em dois grupos de pacientes que utilizavam ou não suplementação com enzimas pancreáticas. A distribuição dos alelos e haplótipos revelada por dois marcadores provou ser sempre diferente em pacientes com ou sem insuficiência pancreática em todas as populações estudadas. No caso de um haplótipo que estava presente em 73% de todos os cromossomos de pacientes com FC desta amostra, foi encontrada homozigose em apenas 28% dos pacientes com insuficiência pancreática em contraste com 64% dos pacientes que eram homozigotos com insuficiência pancreática. Assim como outros autores, eles concluíram que a insuficiência ou

insuficiência pancreática está associada com diferentes mutações no locus próximo ao gene CFTR.

Segundo MacLusky et al. (1985) a obstrução do ducto pancreático ocorre no período intra-uterino, quando há inflamação, com perda de função e fibrose do órgão. A má-digestão e má-absorção são clinicamente reconhecidos após a destruição de 90% do pâncreas exócrino. Assim sendo, há necessidade da ingestão de suplementos enzimáticos juntamente com o alimento e a manutenção da ingestão de dieta altamente calórica, que ajuda o corpo em absorver os nutrientes. Cipolli et al. (2007), relatam a existência de dois subgrupos de pacientes com suficiência pancreática: Os que permanecem suficientes pela vida toda e os que se tornam insuficientes entre o primeiro ano de vida até o início da adolescência.

Sharer et al. (1998) demonstraram que heterozigotos para mutações da CFTR possuem maior chance de apresentar pancreatite idiopática crônica, especialmente quando a mutação estiver associada ao número pequeno de timidinas no íntron oito do gene da CFTR. Quanto menor for a sequência, menor será a proporção de RNA mensageiro normal da CFTR.

1.3.2.2- Íleo meconial

O íleo meconial ocorre entre 10% a 20% dos recém nascidos com FC, sendo a manifestação mais precoce da doença. O paciente tem dificuldade de eliminar o mecônio, material gastro-intestinal do recém-nascido, que acaba por bloquear o intestino. Os sinais de obstrução intestinal podem aparecer dentro de 48 horas do nascimento. O diagnóstico pode ser feito por radiografia de abdome que demonstrará a distensão abdominal acentuada. Antes de 1970, pacientes com o íleo meconial apresentavam taxa de mortalidade de até 70% e a sobrevida era reduzida quando comparada aos pacientes que não apresentaram o íleo. (Munck et al., 2006).

Pacientes com FC que desenvolveram quadro de íleo meconial apresentaram piora na prova de função pulmonar quando comparados a pacientes FC que não tiveram íleo meconial e foram diagnosticados por triagem neonatal (Evans et al., 2001). Deste

modo, esses autores sugerem que o íleo meconial demonstra fenótipo mais grave de FC. Em contraste, Munck et al. (2006) demonstraram que a presença do íleo meconial não representa fator de risco para doença, quando comparado a outro grupo de pacientes sintomáticos que tiveram o diagnóstico de FC no início da vida.

1.3.3- Infertilidade

Pacientes com FC apresentam variedades de fenótipos genitais, podendo ser férteis, apresentar espermatogênese alterada ou apresentar Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (ACBVD), que consiste em anormalidade dos ductos reprodutivos, caracterizados por atrofia, fibrose ou ausência do epidídimo, vaso deferente, vesícula seminal ou ductos ejaculatórios (Wu et al., 2005). Segundo dados de Quinzii e Castellani (2000), 98% dos homens fibroscísticos apresentam azoospermia devido a ACBVD.

Barreto et al. (1991) concluíram que o pai de menina com fenótipo grave de FC, também possuía a doença, entretanto com fenótipo mais ameno. A criança era homozigota para a mutação $\Delta F508$ e o pai era heterozigoto composto para a mutação $\Delta F508$, a segunda mutação estava associada com o haplótipo C.

A espermatogênese não está comprometida na maioria dos casos, entretanto, alterações obstrutivas não permitem a progressão dos espermatozóides até a uretra. Nestes casos, a opção seria a fertilização assistida. Entretanto, levando em consideração o estado de saúde e a baixa expectativa de vida do pai, é necessário acompanhamento multidisciplinar bem como aconselhamento genético. (Hubert et al., 2006)

A infertilidade masculina também poderá ocorrer no estado heterozigoto para alguma mutação da CFTR, especialmente quando associada com o número polimórfico de timidinas no íntron 8, especificamente o alelo 5T (Radpour et al., 2007).

Oppenheimer et al. (1970) sugeriram que as características do muco cervical podem esclarecer a infertilidade nas mulheres com FC. Wang et al. (2003) demonstraram que células epiteliais do endométrio possuem mecanismo de transporte de bicarbonato

mediado pela CFTR. Co-culturas de esperma com células endometriais tratadas com oligonucleotídeo “antisense” para CFTR, ou com células epiteliais de FC com defeitos na secreção de bicarbonato, resultaram em menor capacitação do esperma e menor habilidade de fertilização de óvulos. Estes resultados foram considerados consistentes ao papel crítico da CFTR em controlar a secreção uterina de bicarbonato e a capacitar a fertilização do esperma, fornecendo ligação entre a CFTR defeituosa e fertilidade feminina reduzida em mulheres com FC.

1.3.4- Outras afecções

1.3.4.1 – Sinusite e pólipos nasais

A sinusite é manifestação universal em pacientes com FC e funciona como reservatório para infecções, devendo ser tratada com antibióticos, cirurgia ou corticóides inalados. Os pólipos nasais são mais frequentes em pacientes idosos, podendo ser tratados com esteróides locais ou cirurgia. (Gentile e Isaacson, 1996).

Woodworth et al. (2007) associaram os pacientes homozigotos para mutação $\Delta F508$ a maior incidência de sinusite quando comparados a pacientes com outros genótipos.

1.3.4.2- Fígado

Gaskin et al. (1988) demonstraram que 96% dos pacientes com FC e evidência de doença do fígado, apresentavam obstrução no trato biliar, usualmente a obstrução do ducto biliar distal comum. Todos os pacientes sem doença do fígado possuíam função intra-hepática normal e excreção normal no ducto biliar distal comum.

Gabolde et al. (2001) mostraram que a presença de cirrose hepática em pacientes com FC está significativamente associada a variantes alélicas do sítio de ligação e empacotamento da manose (LEM). Os autores compararam o genótipo de 216 homozigotos

para a mutação $\Delta F508$. Apenas 5,4% dos casos de cirrose hepática apresentava variantes selvagens da LEM, enquanto 30,8% dos casos eram homozigotos ou heterozigotos compostos nos alelos na LEM. ($p=0,008$).

Hepatopatias sintomáticas ocorrem em menos de 5% dos pacientes adultos com FC, mas estudos de necropsia revelaram que 50% dos pacientes eram portadores de cirrose. A principal manifestação clínica de doença hepática nesses pacientes é a hepatomegalia, que constitui importante fator prognóstico. (Fields et al., 2006).

A doença crônica de fígado é observada em 13 a 25% das crianças com FC. A expectativa de vida aumentada e acompanhamento prolongado favoreceram uma melhor descrição das manifestações hepáticas na FC e permitiram observação direta do aumento de casos. Doenças hepáticas geralmente se desenvolvem na primeira década de vida, com incidência muito menor após os 10 anos de idade. (Akata e Akhan, 2007).

1.3.4.3- Carcinoma

Siraganian et al. (1987) apontaram o adenocarcinoma do íleo em três homens com FC. O diagnóstico foi efetuado entre os 29 e os 34 anos de vida.

Neglia et al. (1995) executaram estudo retrospectivo em 28.511 pacientes com FC de 1985 a 1992 nos Estados Unidos e Canadá. O número dos casos observados foi comparado com o número esperado, calculado com dados populacionais de incidência de câncer. Analisaram também valores proporcionais de incidência para avaliar a associação entre cânceres específicos e a FC na Europa. Os resultados finais indicaram que embora o risco total do câncer nos pacientes com FC fosse similar aquele da população sadia, há risco aumentado de câncer no trato digestivo. Recomendaram que os sintomas gastro-intestinais persistentes ou inexplicáveis em pacientes com CF devem ser investigados cuidadosamente.

1.3.4.4- Diabetes Mellitus

Diminuição da tolerância à glicose e diabetes ocorre mais freqüentemente em pacientes adultos que em crianças. 50% dos pacientes com FC são diabéticos aos 30 anos de idade. Esta anormalidade é chamada de Diabetes relacionada à FC, a qual se mostra diferente dos tipos um e dois. O tratamento inclui orientação dietética, uso de hipoglicemiantes orais ou insulina (Andersen et al., 2006).

1.3.4.5- Osteoporose

Pacientes com FC são considerados de alto risco para o desenvolvimento de osteoporose, particularmente os adultos. Isto se deve ao fato da má absorção de proteínas, da falta de exercício físico e da utilização contínua de corticosteróides. Alguns deles têm desequilíbrio hormonal e muitos têm absorção defeituosa de cálcio e vitamina D. Devido a esse risco, os pacientes com FC devem ser monitorizados em relação aos níveis de cálcio e vitamina D e anualmente submetidos a densitometria óssea. O tratamento visa reposição de cálcio e vitamina D, agentes bifosfonados e reposição hormonal (Cawood et al., 2005).

1.3.4.6- Implicações psico-sociais

Segundo Quinzzi e Castellani (2000) a questão da infertilidade é delicada e deve ser abordada cedo, antes que o paciente atinja a idade adulta, para que alternativas reprodutivas sejam propostas. Devido a esses e outras implicações da doença (Quadro 1), todo paciente com FC de receber suporte psicoterápico.

Blau et al. (2003) descreveram características de 25 pacientes com FC, com idade entre 20-50 anos. Dezenove receberam diagnóstico quando criança e seis já adultos. Dezenove apresentavam insuficiência pancreática enquanto seis eram suficientes pancreáticos, incluindo cinco diagnosticados adultos. O quadro pulmonar geralmente se mantinha estável, sem diferença entre os dois grupos. Sessenta por cento estavam empregados, 36% eram casados, e 40% tinham filhos (sem nenhum caso de FC recorrente), concluindo assim que adultos com FC geralmente possuem boa qualidade de vida.

Quadro 1- Espectro das manifestações clínicas em pacientes com FC.

Órgão	Desordem	Manifestação Clínica
Glândula Sudorípara	Suor salgado	Alcalose hipoclorêmica crônica. Exaustão ao calor (perda aguda de sal)
Esôfago e Estômago	Refluxo esofágico, Hiperacidez gástrica.	Esofagite, gastrite, duodenite.
Pâncreas	Obstrução ductal. Secreção inapropriada de enzimas, cloro e bicarbonato	Insuficiência pancreática exócrina. Desnutrição e Diabetes
Intestino	Muco denso	Íleo meconial. Obstrução intestinal distal. Reabsorção defeituosa de ácidos biliares.
Fígado e Trato Biliar	Elastase ductal biliar. Esclerose biliar.	Cirrose multilobular ou focal. Hipertensão porta. Colangite esclerosante. Litíase Biliar
Vias aéreas	Obstrução, infecção e inflamação	Evolução crônica, doença broncopulmonar e suas complicações
Vasos deferentes	Ausência, obstrução	Azoospermia obstrutiva. Infertilidade
Nariz e seios paranasais	Inflamação e infecção	Sinusite. Mucocoele de seio paranasal. Pólipos nasais. Anosmia

Fonte: Quinzii e Castellani, (2000); Goss e Burns (2007).

Goldbeck et al. (2007) monitoraram a Qualidade de Vida (QV) em 108 adolescentes e adultos com FC (idade 15-47 anos) através da aplicação de “questionários de qualidade da vida” paralelamente com os testes de função pulmonar. A QV permaneceu estável quando comparada com o escore do teste anterior. Por outro lado, intervalos maiores entre os testes, nova colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, exacerbação de

infecções e viver separado de parentes puderam predizer significativamente a QV no segundo teste. Com isso, concluíram que fatores clínicos, como exacerbações pulmonares e vida social possuem impacto na QV de pacientes com FC.

1.4- Fisiopatologia

Os indivíduos com FC apresentam permeabilidade reduzida do íon cloro, ou seja, este íon tem dificuldade em ir para o exterior da célula, ficando assim muito concentrado no interior desta, o que aumenta a absorção de sódio. Assim as células absorverão mais água do que o normal. (Goss e Burns, 2007).

- Existe elevada diferença de potencial através do epitélio nasal ou traqueal e o sangue.
- Ocorre aproximadamente o dobro de fluxo de sódio e conseqüentemente da água para o interior da célula epitelial respiratória, provocando desidratação do meio justacelular dentro da luz dos brônquios;
- A membrana apical das células é relativamente impermeável ao cloro devido à conhecida falha dos canais de cloro em abrir normalmente em resposta a agentes que estimulam a AMP cíclico, fato que impede a adequada re-hidratação do muco nos brônquios.

O defeito primário da FC é devido a anormalidade na função da membrana celular, e a secundária se deve ao defeito estrutural ou funcional da CFTR.

1.5- Genética

O defeito básico da doença consiste na mutação do gene que codifica a proteína transmembrana reguladora da condutância iônica (CFTR). O RNA mensageiro produzido pelo gene CFTR, é transcrito em uma proteína transmembrana (figura 2), que possui 1480

aminoácidos, com massa molecular de 168.138 dáltons, da família das proteínas ATP reguladoras de transporte de íons. Mutações no gene da CFTR estão relacionadas com a causa da FC e CBAVD devido à produção de uma proteína anômala, resultando em fluxo de condução de íons defeituoso na membrana plasmática das células epiteliais (Rommens et al., 1989; Riordan et al., 1989; Davies, 2006).

As mutações conhecidas podem ser divididas em cinco classes (Zielenski e Tsui, 1995). A primeira, que engloba metade das mutações, impede a transcrição da CFTR em seu RNA mensageiro completo. As mutações sem sentido, em sítios de splicing e mudanças na matriz de leitura são as mais encontradas nesta classe. A mutação mais freqüente desta classe é a G542X, que produz um códon de parada da transcrição, formando uma proteína truncada.

A segunda classe, que inclui a mutação $\Delta F508$, bloqueia os eventos pelos quais a proteína se torna madura, impedindo que esta chegue à membrana e ainda impedem que a proteína assuma sua conformação correta. Mickle e Cutting (2000), definem os pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$, como os que possuem fenótipo clássico da doença, o que inclui elevadas concentrações de eletrólitos no suor, insuficiência pancreática e doença pulmonar obstrutiva.

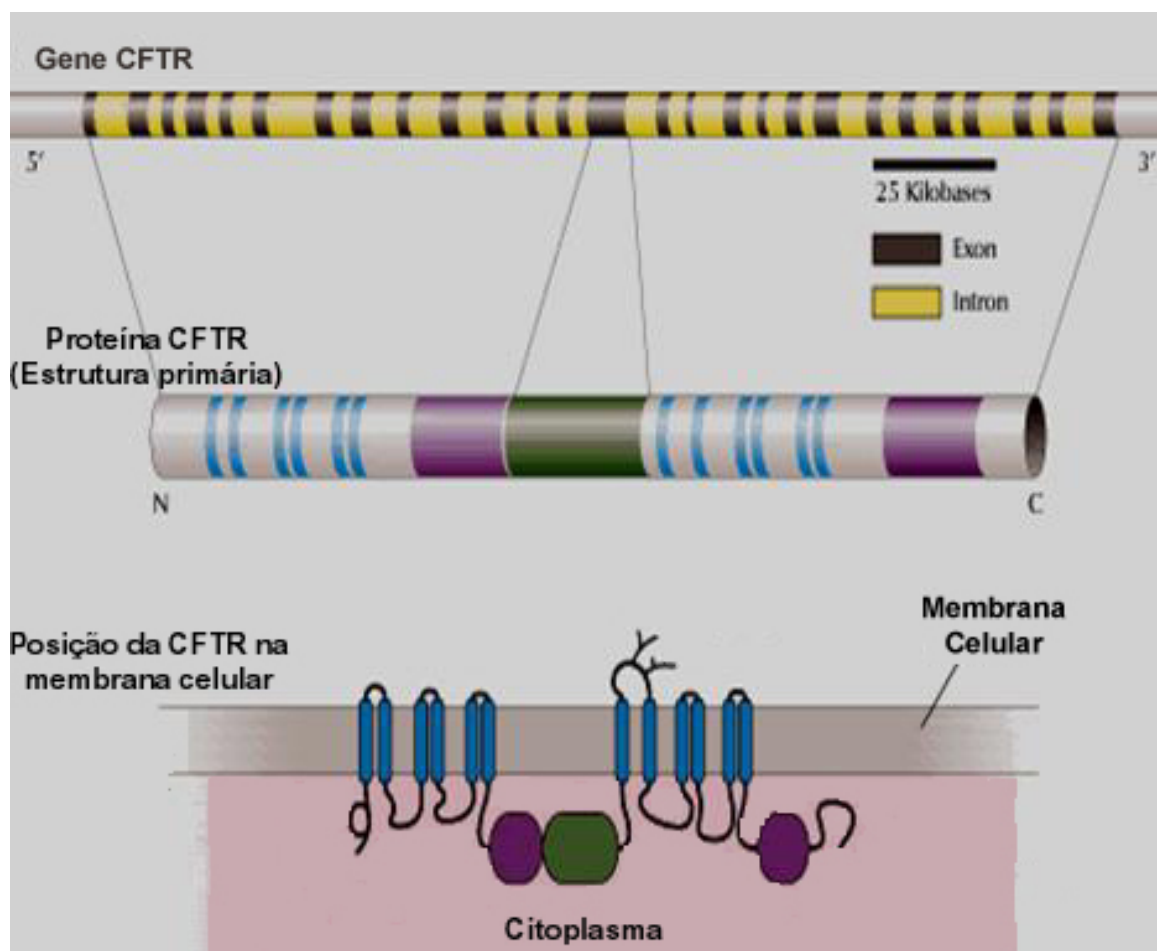


Figura 2- Caracterização do gene CFTR humano e seu transcrito. Esta proteína se fixa na membrana celular por doze segmentos transmembrana (azul). Estes segmentos formam um canal através do qual passa o cloro e talvez água. Nos domínios de união de nucleotídeos, DUN1 e DUN2, em rosa e violeta respectivamente, há uma interação com o ATP para liberar a energia necessária para a função da CFTR. O domínio R (em verde) possui muitos sítios para fosforização por quinases dependentes do AMPc. Este domínio está relacionado com a regulação das funções da CFTR, tais como a condutância do cloro. A mutação mais freqüente na CFTR, $\Delta F508$, se localiza na região DUN1. Esta região, assim como a DUN2 são especialmente susceptíveis a mutações.

(adaptado de <http://www.medwave.cl/cursos/Genetica2004/Enero2005/2.act>)

Já a terceira classe, permite o amadurecimento e posicionamento da proteína na membrana celular, mas não permite seu funcionamento. Nesta se inclui a mutação G551D, que também é associada ao clássico fenótipo da doença. Na quarta classe, a proteína está em funcionamento na membrana, mas seu poder de condução está reduzido. Na quinta classe, a proteína se encontra em quantidade reduzida. As classes IV e V descrevem mutações com fenótipo menos severo do que as três primeiras (Kerem, 2006) (Figura 3).

Kerem (2006) sugeriu diferenças no tratamento dos pacientes com FC de acordo com a classe da mutação a que eles possuem. Esta foi a primeira descrição fármaco-genômica para esta doença.

1.5.1- Heterogeneidade

Kulczycki et al. (2003) relataram que seu paciente mais velho era homem, branco, com 71 anos que recebeu o diagnóstico de FC aos 27 anos de idade por polipose nasal recorrente, teste de suor alterado e histórico de FC em sua irmã de 20 anos. Este homem era casado, sem filhos e trabalhou como advogado. Exames urológicos revelaram ACBVD. O estado nutricional e pulmonar estavam quase normais. Com 60 anos, o teste genético indicou duas mutações no gene da CFTR: His1282-ter que é associada a quadro grave e a ala445-glu que está associada a quadro moderado.

Em 69 pacientes italianos com fibrose cística devido a presença de dois alelos com a mutação $\Delta F508$, De Rose et al. (2005) descobriram que pacientes que também possuíam o alelo R131 do gene receptor da imunoglobulina gama apresentaram chance de risco de adquirir infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* quatro vezes maior, sugerindo que variações deste locus contribuem com a susceptibilidade de pacientes com FC a contraírem esta infecção.

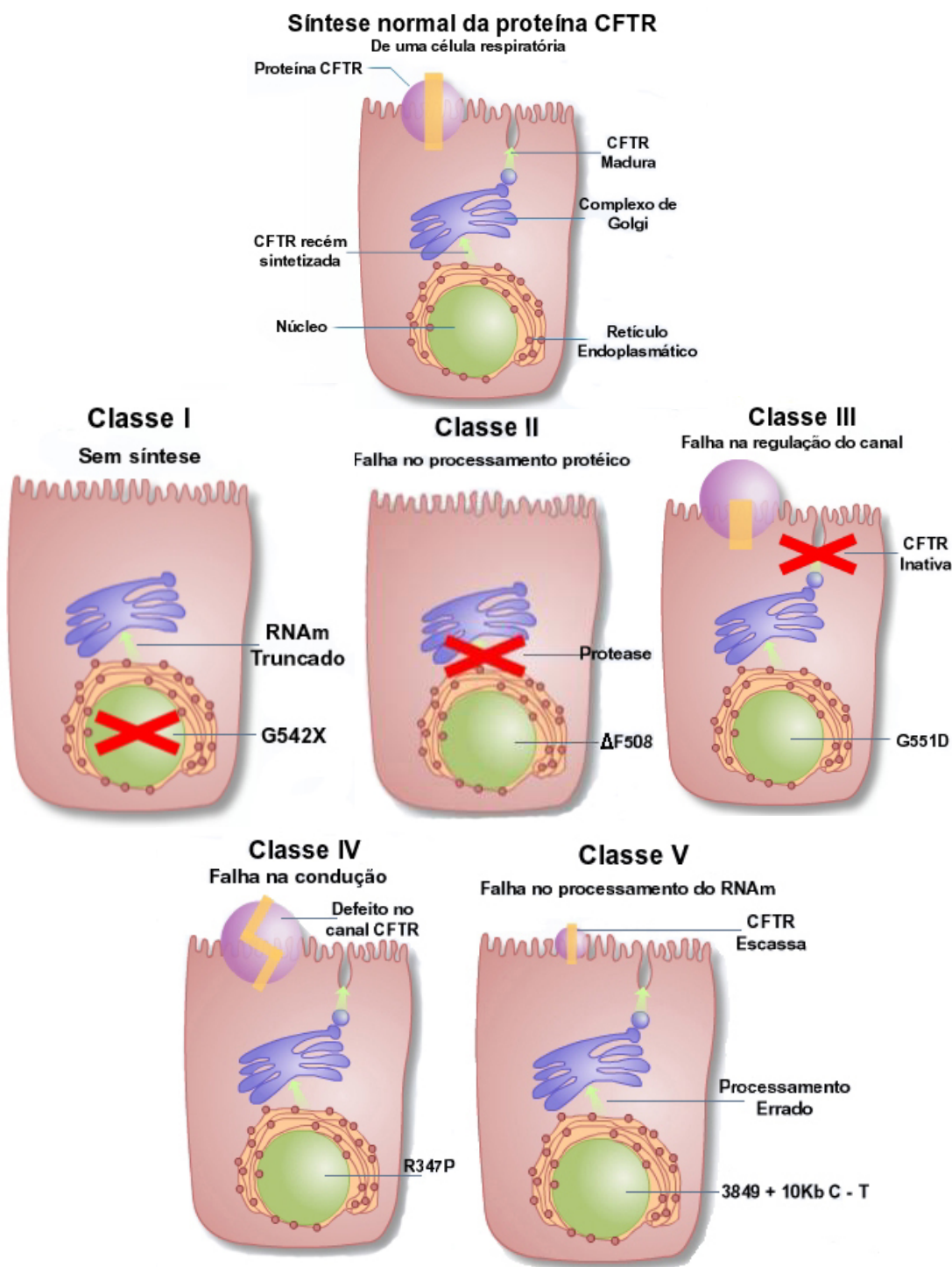


Figura 3- As diferentes classes de mutação na proteína CFTR. (Adaptado de <http://www.planetegene.com/view/les-differentes-classes-de-mutations-de-la-rotein>).

Derichs et al. (2005) encontraram uma criança, com genitores consangüíneos na Turquia, que era homozigota para mutação L997F. A criança mostrou desenvolvimento normal, sem evidência de doença pancreática ou FC. Os testes do suor e de secreções intestinais se mostraram normais. Com isso, foi concluído que a mutação L997F não causa FC.

Fischer et al. (2004) descobriram que a vitamina C induz a abertura dos canais de cloro CFTR ao aumentar a probabilidade de abertura do canal sem que ocorra aumento no nível de AMPc. A exposição da superfície das vias aéreas a concentrações fisiológicas de vitamina C estimulou a secreção de cloro trans-epitelial. Quando administrado no epitélio nasal humano, a vitamina C ativou o transporte de cloro. Com isso, o grupo concluiu que a vitamina C celular é regulador biológico da secreção epitelial de cloro através da CFTR.

Stanke et al. (2006) genotiparam marcadores em 37 famílias com irmãos homozigotos para mutação $\Delta F508$ e variações clínicas, em busca de potenciais modificadores da severidade da doença. No cromossomo 12p13, cercando os genes da Subunidade 1A do Canal de Cloro Epitelial (S1ACCE) e do receptor alfa-TNF, e no cromossomo 16p12 cercando os genes S1BCCE e S1GCCE. Desequilíbrio de transmissão foi observado na S1GCCE e foi observada discordância de associação intrapares com fenótipo da FC na S1BCCE. Dados familiares baseados em estudos de caso-controle e sequenciamento demonstraram uma associação entre haplótipo do alfa-TNF com a severidade da doença. Em conclusão, os genes S1ACCE, S1GCCE e o alfa-TNF podem modular a gravidade da FC, efetuando variações na mucosa das vias aéreas e na resposta inflamatória do hospedeiro.

1.5.2- Genética populacional

Atualmente, foram encontradas 1.542 mutações no gene CFTR (Figura 4). A frequência dessas mutações varia de acordo com a etnia e localização geográfica da população estudada. Desta forma, 42% das variantes responsáveis pela FC são mutações de

troca de aminoácido na proteína, ou seja, de sentido trocado; em 16% dos casos, há erro na matriz de leitura, levando a uma proteína truncada; 12% são mutações no sítio de emenda do RNA; 10% mutações sem sentido, gerando sítio de parada da transcrição do DNA. 5% são grandes inserções ou deleções de material genético e 15% das mutações são apenas variações da sequência, não desenvolvendo a FC. Mutações ocorrem principalmente nos éxons: 4; 7; 13 e 17b (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)

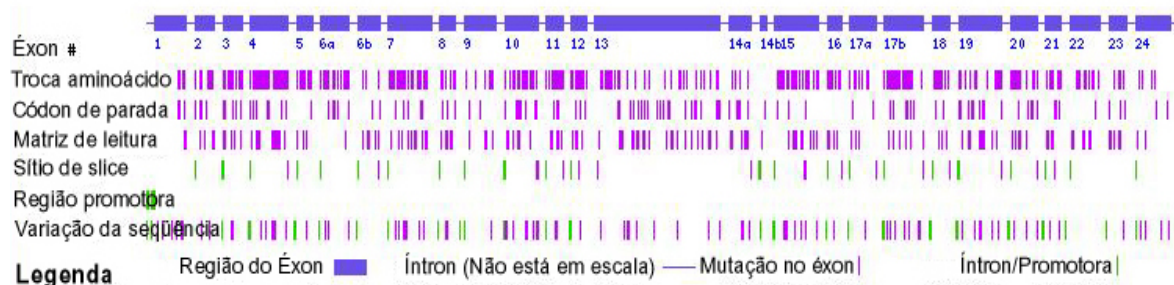


Figura 4- Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da CFTR
(Adaptado <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr> acesso em 05 de junho de 2007)

Morral et al. (1994) analisando haplótipos microssatélites para $\Delta F508$ e cromossomos normais, demonstraram que esta mutação ocorreu pelo menos 52.000 anos atrás, em uma população geneticamente distinta de qualquer grupo europeu atual, e que se espalhou pela Europa em diferentes tempos cronológicos, assim explicando as diferentes prevalências desta mutação em todo mundo.

Kerem et al. (1995) descreveram a frequência de mutações da FC em diferentes grupos étnicos de judeus. Até aquele momento, somente 12 mutações foram identificadas em Israel, o que permitiu a identificação de 91% das mutações no gene CFTR entre judeus com FC. Entretanto, em cada grupo étnico de judeus, a doença foi causada por repertório diferente de mutações. Lerer et al. (1992) relataram que a mutação $\Delta F508$ é responsável por 33,8% dos alelos de judeus com FC. Em busca de dados para melhor aconselhamento genético, Quint et al. (2005) descreveram 99% das mutações entre judeus ashkenazi, 91% entre judeus do norte da África, e apenas 75% das mutações dos judeus iraquianos.

Em trabalho nos Países Baixos, de Vries et al. (1997) testaram a frequência de portadores da mutação $\Delta F508$ analisando amostras de mucosa oral combinadas com amostras de 11.654 doadores de sangue de toda parte do país. Detectaram uma frequência de portador $\Delta F508$ de um em 42 (95% IC 1/37 a 1/47). Supondo que a frequência relativa da mutação $\Delta F508$ entre portadores e pacientes é comparável nos Países Baixos, estimaram a frequência total de portadores da FC sendo um em 32, significativamente menor que os um em 25, usualmente citados. Aumento na frequência de portadores foi relacionado a uma distância crescente da região nordeste do país, assim confirmando que há variação na frequência do gene, com frequências baixas na parte nordeste do país e com altas frequências na parte do sul.

Brock et al. (1998) estudaram 27.161 mulheres registradas em clínicas de exame pré-natal na Escócia entre 1990 e 1997. Todas as 27.161 foram selecionadas para a análise das mutações $\Delta F508$, G551D, G542X. Em 14.360 mulheres a mutação R117H também foi analisada. Além disso, 183 pacientes com FC foram estudados para a presença destas mutações. Baseado em seus dados, os autores estimaram que incidência da FC na população escocesa foi de um em 1984 com intervalos de confiança de 95% entre um em 1.692 a um em 2.336.

O European Working Group on CF Genetics (1990) publicou informação sobre a distribuição da mutação $\Delta F508$ na Europa. Os dados indicaram impressionante variação através da Europa com valores baixos no sudeste (30% na Turquia) a valores elevados no noroeste (88% na Dinamarca). O grupo sugeriu que a propagação do gene da FC pode ter acompanhado as migrações dos primeiros fazendeiros que partiram do Oriente Médio e lentamente progrediram para o noroeste de Europa. A difusão do gene pode ter sido favorecida por vantagem seletiva conferida por este gene.

Para determinar se a mutação 3120+1G-A possui origem comum entre diferentes populações ou se a sua ampla distribuição foi resultado de eventos mutacionais recorrentes, Dörk et al. (1998) analisaram amostras de DNA obtidas de 17 pacientes não aparentados de quatro populações diferentes e de oito pacientes africanos também não aparentados. Encontraram haplótipos estendidos idênticos da CFTR para os alelos 3120+1G-A entre os africanos, árabes e afro-americanos, sugerindo que a mutação possuiu

origem ancestral comum. Esta descoberta não foi surpreendente no caso dos africanos e afro-americanos. Entretanto, não foi fácil explicar o caso dos africanos e árabes. Misturas étnicas recentes foram responsáveis por pequena percentagem de africanos na Arábia Saudita, entretanto, esta foi considerada uma explicação inconsistente, pois nenhuma das famílias sauditas com a mutação apresentou fatores antropomórficos de descendência africana. No passado, contínuo fluxo gênico entre populações árabes e africanas provavelmente persistiu por muitos séculos, associados com o comércio e com a propagação da religião Islâmica. Assim, a população grega foi a única a apresentar a mutação 3120+1G-A entre caucasóides. Evento mutacional recorrente parece ser improvável devido ao haplótipo grego diferir dos outros em poucos aspectos. Contatos históricos, como o domínio de Alexandre o Grande ou durante a antiga civilização minuana, podem fornecer uma explicação para ancestral comum desta mutação em amostras de populações étnicas diversas. Dörk et al. (1998) concluíram que a mutação 3120+1G-A é muito antiga e deve ser mais comum do que se imaginava em populações de áreas tropicais e sub-tropicais, onde a FC ainda é sub-diagnosticada.

A população Basca é conhecida por ser uma das mais antigas da Europa, se estabelecendo na Europa ocidental durante o período Paleolítico antigo. Euskera, a língua Basca, é de origem pré-Indo-Européia, criada pelos primeiros colonizadores europeus. A distribuição variável da mutação $\Delta F508$ na Europa, com frequências mais elevadas no norte da Europa e frequências mais baixas no sul da Europa, foi atribuída a uma propagação da mutação pelos primeiros fazendeiros que migraram do Oriente Médio durante o período neolítico. Entretanto, uma frequência muito alta desta mutação foi encontrada nas províncias Bascas, onde a incidência da FC é de aproximadamente um em 4.500 (Figura 5) (Estivill et al., 1997). Em estudo de 45 famílias de FC nas províncias Bascas, Casals et al. (1992) encontraram que a frequência da mutação $\Delta F508$ era de 87% dos cromossomos de indivíduos de origem Basca pura e 58% naquelas de origem Basca miscigenada. Ficou então provado que a mutação $\Delta F508$ está presente na Europa há mais de 10.000 anos, precedendo as migrações agrícolas que diluíram a mutação ao invés de introduzi-la.

Tabela 5- Distribuição geográfica da mutação $\Delta F508$ entre pacientes em diversos países.
(Bobadilla et al., 2002).

País	Porcentagem de $\Delta F508$ (%)
Dinamarca	87
Bélgica	75
Inglaterra	75
Holanda	74
Alemanha	72
República Tcheca	70
Irlanda	70
Estados Unidos	69
França	68
Suíça	67
Áustria	63
Noruega	62
Argentina	59
Suécia	57
Rússia	54
Grécia	53
Espanha	53
Itália	51
Portugal	45
México	41
Colômbia	35
Brasil (São Paulo)	32
Chile	29
Equador	25
Turquia	25
Algéria	20
Tunísia	18

Grebe et al. (1994) executaram análises moleculares em 129 cromossomos de indivíduos latino-americanos com FC no sudoeste dos Estados Unidos. Somente 46% (59 de 129) carregaram a mutação $\Delta F508$.

Nam et al. (2005) não encontraram a mutação $\Delta F508$ em amostra de 495 doadores de sangue, escolhidos aleatoriamente entre indivíduos saudáveis da cidade de Hanói, no Vietnã. Este foi o primeiro estudo do gene da FC entre vietnamitas, sendo consistente com outros dados da literatura, demonstrando baixa incidência da FC neste país.

Segundo Cuppens et al. (1990), a mutação G542X foi responsável por 7,3% dos cromossomos belgas de pacientes com FC, sendo provavelmente a segunda mutação mais freqüente, atrás da mutação $\Delta F508$, presente em 68,1% destes cromossomos. Loirat et al. (1997) sugeriram que a mutação G542X provavelmente tem origem fenícia. Eles mostraram que a freqüência de G542X varia entre cidades de origens diferentes, sendo mais baixa em europeus do nordeste do que em europeus do sudoeste. Mapearam a mutação G542X pela regressão múltipla de freqüências que cobriu 28 países (53 pontos geográficos) e foi baseada em dados de 50 laboratórios. Valores mais elevados da freqüência desta mutação corresponderam aos locais antigos de ocupação fenícia ocidental.

De acordo com Bobadilla et al. (2002), a mutação G551D é a terceira mutação mais comum da FC, com freqüência global de 2,1% entre cromossomos de CF. As regiões com alta freqüência correspondem as áreas com grandes populações da descendência Celta. As mutações W1282X e N1303K provavelmente possuem a quarta e quinta posição no ranking da prevalência global, estando situadas nos Éxons 20 e 21 respectivamente, apesar de sua freqüência ser menor do que 1,5%. A mutação R553X é a sexta freqüência mais elevada mundialmente, beirando 1%.

Através de amostras de laboratórios de toda Europa e Estados Unidos, Osborne et al. (1992) identificaram 216 amostras de N1303K entre quase 15.000 cromossomos de FC testados, encontrando freqüência de 1,5%. A freqüência era maior no sul do que no norte europeu e não foi encontrada no Reino Unido em americanos negros ou australianos.

Nas comunidades de judeus ashkenazi em Israel, Shoshani et al. (1992) encontraram a mutação W1282X em 63 cromossomos de 97 famílias com frequência de 60% dos cromossomos de indivíduos com FC carregando esta mutação.

Em estudo das mutações da FC em casos do sul europeu, Gasparini et al. (1991) encontraram a mutação R1162X em dois de 16 cromossomos não $\Delta F508$ analisados.

Em Israel, Abeliovich et al. (1992) observaram que entre 94 pacientes judeus Ashkenazi com FC, cinco mutações ($\Delta F508$, G542X, W1282X, e N1303K e 3849+10kbC-T) explicaram 97% dos alelos mutantes da CFTR, sendo a última responsável por 4% dos alelos.

Pardoa et al. (1999) fizeram a triagem da mutação 3120+1G-A em 1.152 negros saudáveis de diversas partes do continente africano e em nove negros com FC. A frequência de heterozigotos para esta mutação foi de um em cada 91 sul-africanos (IC 95% de 1/46 a 1/197). As mutações A559T, S1255X, e 444delA também foram analisadas em parcela desta amostra, entretanto elas não estavam presentes nos 373 indivíduos saudáveis analisados. Levando em consideração que esta mutação está presente entre 15% a 65% dos cromossomos com mutações da FC em negros sul-africanos, a frequência de portador correta estaria entre 1/14 a 1/59. Conseqüentemente, a incidência de FC deve estar entre um em 784 a um em 13.924 nascimentos nesta população. Com base nestes dados, foram relatadas algumas hipóteses as quais esta doença não tem sido relatada nesta população.

Outras mutações no gene CFTR são normalmente raras. Além do grande número de mutações, muitos polimorfismos foram identificados no gene CFTR. Estes polimorfismos são variações na sequência gênica, que difere de mutações, pois são encontrados com frequência maior do que 1% na população. Entretanto, já está bem definido que certos polimorfismos alteram a quantidade funcional do produto gênico. O exemplo mais bem estudado é o polimorfismo da timidina no íntron 8. Neste caso, existe variações de cinco, sete ou nove no número de timidinas (T). A variante 5T diminui significativamente a quantidade do transcrito da proteína CFTR, devido ao íntron oito sofrer uma emenda incorreta, o que gera RNAm sem o éxon 9. Na rotina clínica, somente número limitado de mutações são procuradas. Na maioria dos centros de FC, são

procuradas entre três a 30 mutações. Se for considerado necessário, poderá ser feita análise mais extensa deste gene em alguns centros e, em casos extremos, já é possível uma busca no gene CFTR inteiro, a fim de desvendar uma mutação rara ou nova, levando em conta o alto custo de tempo e recursos. Esta estratégia permitiu a identificação de seletivo grupo de pacientes com doença muito parecida com a FC, porém sem nenhuma mutação. (Davies, 2006).

1.5.3- Evolução

Hansson (1988) especulou se o defeito no controle do canal do íon cloro, da membrana apical do intestino, oferecia vantagem seletiva a heterozigotos do gene causador da FC, na forma de resistência a toxinas bacterianas que levam a quadro de diarreia. Romeo et al. (1989) sugeriram que esta vantagem seletiva dependia essencialmente da alta resistência a secreção de íons cloro em casos de diarreia, o que pode ter favorecido no passado, maior sobrevivência de crianças heterozigotas para o gene da FC.

Rodman e Zamudio (1991) sugeriram que a resistência à cólera pode ter sido o fator ambiental que selecionou os heterozigotos para FC sobre os homozigotos normais. Esta hipótese obteve embasamento experimental com as observações de Gabriel et al. (1994) que, ao estudarem ratos transgênicos que não expressavam a proteína CFTR, perceberam que eles não secretavam fluidos em resposta a toxina colérica. Heterozigotos expressaram 50% da proteína CFTR normal no epitélio intestinal e secretaram 50% do fluido normal e íons cloro em resposta a toxina colérica. Esses dados sugeriram que heterozigotos para mutações da FC podem apresentar vantagem seletiva quando exposto ao *Vibrio cholerae*.

Pier et al. (1998) investigaram se a alta resistência a febre tifóide em heterozigotos poderia ser fator para a manutenção de alelos mutantes da CFTR em níveis tão altos em algumas populações. A febre tifóide é iniciada quando a *Salmonella typhi* penetra a mucosa das células epiteliais do sistema gastrointestinal. Foi descoberto que a *S. typhi* utiliza a CFTR para adentrar o epitélio. Células que expressam a CFTR selvagem

foram mais infectadas pela *S. typhi* do que as células que continham a mutação mais comum da FC, $\Delta F508$. Camundongos heterozigotos para a mutação $\Delta F508$ desenvolveram 86% menos *S. Typhi* na mucosa gastrintestinal quando comparadas com camundongos selvagens. Não houve desenvolvimento em camundongos homozigotos para a mutação $\Delta F508$. Os autores concluíram que níveis menores de expressão da proteína CFTR em heterozigotos diminuem a susceptibilidade a febre tifóide.

van de Vosse et al. (2005) testaram a hipótese de que heterozigotos para CFTR apresentam uma vantagem seletiva para a febre tifóide, a qual poderia ser conferida devido a redução de fixação da *S. typhi* na mucosa intestinal. Foram genotipados pacientes e controles em uma região da Indonésia, onde a febre tifóide é endêmica, para dois marcadores altamente polimórficos da CFTR e a mutação $\Delta F508$. Em harmonia com a incidência muito baixa de FC na Indonésia, a mutação $\Delta F508$ não foi encontrada em pacientes ou controles. Entretanto, foi encontrada uma associação significativa entre um polimorfismo comum no íntron oito e vantagem seletiva contra a febre tifóide.

Högenauer et al. (2000) utilizaram a técnica de perfusão intestinal para mensurar a atividade basal *in vivo* e a secreção de cloro jejunal estimulada de prostaglandina em heterozigotos, homozigotos normais e pacientes com FC. Pacientes com FC não apresentaram secreção de cloro no estado basal, e a secreção não foi estimulada por análogo da prostaglandina. Entretanto, heterozigotos secretaram íons cloro em níveis idênticos aos homozigotos normais. Se for assumido que heterozigotos apresentam uma função reduzida da CFTR intestinal em comparação a homozigotos normais, esses resultados revelaram que a expressão da CFTR não limitou a atividade secretora de cloro nos heterozigotos. Estes resultados não amparam a teoria de que altas frequências de mutações da FC se devem a vantagem seletiva conferida a heterozigotos que contraíram doenças causadoras de diarreias mediadas por hiper secreção de cloro, como por exemplo, as infecções causadas pelo *Vibrio cholerae* ou a *E. coli*.

1.5.4- FC na população brasileira

de Miranda et al. (1993) determinaram a frequência alélica da mutação $\Delta F508$ (35%) em 34 pacientes brasileiros, descendentes de latino-europeus, nativos e negróides.

Na cidade de Campinas, Martins et al. (1993) determinaram frequência semelhante (33%) em 24 pacientes. Em estudo complementar realizado por Parizotto et al. (1997) com 60 pacientes, foi encontrado as seguintes frequências: $\Delta F508$ (31,7%), G542X (8,3%), N1303K (2,5%) e G551D (0%) e R553X (0%).

Cabello et al. (1999) em estudo realizado em 44 pacientes do Rio de Janeiro, encontraram frequência alélica de 0,31% para a mutação $\Delta F508$. Também foram analisados 291 indivíduos saudáveis escolhidos aleatoriamente, e somente três portadores desta mutação foram encontrados. Combinando estes dois resultados com dados populacionais do Rio de Janeiro, foram estimadas duas incidências para esta doença: 1:3.542 utilizando apenas os dados experimentais e 1:6.902 quando levado em consideração a mistura étnica.

Em novo estudo realizado entre pacientes da cidade de São Paulo, Okay et al. (2005) estimaram frequência da mutação $\Delta F508$ de 44,45%.

Em outro estudo realizado no Rio de Janeiro, Cabello et al. (2005) efetuaram a triagem das mutações ao longo dos 23 éxons e das regiões de flaqueamento nos íntrons do gene CFTR utilizando a técnica do SSCP seguido por sequenciamento automático em 95 pacientes. A detecção encontrou 45% dos alelos mutados, e uma completa genotipagem (com os dois alelos encontrados) foi de concluída em apenas 34,7% dos pacientes estudados. 21% dos pacientes apresentaram apenas uma mutação. Onze mutações diferentes foram encontradas, sendo que a mais prevalente foi a $\Delta F508$ com frequência de 28,42%.

Raskin et al. (2007) em estudos realizados no Brasil desde 1990, encontraram variações de mais de 20 vezes da incidência da mutação $\Delta F508$ em diversas partes do país.

No último trabalho de nosso grupo, Correia (2005) efetuou triagem de seis mutações em pacientes portadores de Fibrose Cística na região de Campinas. A mutação $\Delta F508$, foi encontrada em 50% dos 140 alelos analisados (frequência alélica 0,50). As outras mutações encontradas foram: G542X (4,29%), R1162X (2,14%), N1303K (1,43%) e R553X (0,71%), e a mutação G551D não foi encontrada.

2- OBJETIVOS

Determinar a prevalência da mutação $\Delta F508$ bem como calcular a incidência da FC em duas amostras populacionais, em Campinas e João Pessoa.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

Foram analisadas 1.152 mulheres, sendo 694 das cidades de Campinas - SP e 458 de João Pessoa – PB, em idade fértil, de diferentes grupos étnicos, que foram coletados em diferentes pontos da periferia das cidades e participaram voluntariamente de projeto de pesquisa anterior do Departamento da Medicina Preventiva e Social da FCM da UNICAMP. Tal projeto utilizou como critério de inclusão mulheres que aceitaram participar do projeto, que se dirigiram ao posto de saúde para vacinação de seus filhos ou acompanhar crianças na vacinação. Como critérios de exclusão, foram excluídos da pesquisa mulheres que faziam suplementação com ácido fólico ou tiveram filho com espinha bífida.

O grupo étnico ao qual as voluntárias se enquadram não estava incluído no questionário aplicado (Anexo 2) e por esta razão, não foi utilizada nenhuma espécie de filtro em relação a grupos étnicos.

Não foram incluídos homens nesta pesquisa, entretanto este fato não irá alterar os resultados esperados, já que o gene responsável pela FC está presente unicamente nos autossomos e sua incidência mundial não difere entre os gêneros.

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

3.2- Caracterização da amostra

O número necessário para efetuar cálculo estatístico foi estabelecido para o projeto anterior. Entretanto, a amostra se enquadra nos padrões estabelecidos por Chakraborty et al. (1993) que calcularam o número necessário de controles para amostras de 50 a 100 pacientes. A utilização de 1000 a 2000 controles é suficiente para cálculo com intervalo de confiança de 95% no caso de doenças autossômicas recessivas, com incidência menor do que 1/5.000.

A idade das voluntárias variou de 15 a 39 anos com mediana de 26,3 anos e desvio padrão de 6,8 anos.

3.3- Método molecular

Foi executada a extração de DNA de leucócitos do sangue periférico através do método do cloreto de lítio. Após a execução desta etapa, iniciou-se a investigação da mutação $\Delta F508$ através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.3.1- Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

A extração de DNA foi efetuada conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986) com modificações.

Aproximadamente quatro mL de sangue periférico foram coletados em tubo Vacutainer contendo, EDTA 15% para impedir a coagulação sangüínea. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2.500 r.p.m., a temperatura ambiente, para a separação e retirada do plasma. Em seguida, uma alíquota de 500 μ L do sedimento foi transferida para tubo eppendorf de 1,5 mL. A essa alíquota foram adicionados 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris-HCl pH7,5 10mM, $MgCl_2$ 5mM, Triton 100X 1%). A solução então foi homogeneizada por 15 segundos e centrifugada a 8.000 r.p.m. por cinco minutos. Em seguida, o conteúdo sobrenadante foi cuidadosamente descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395 μ L de tampão de digestão (Tris-HCl pH 7,5 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e cinco μ L de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após duas horas, foram adicionados 200 μ L de LiCl 7,5N em cada amostra e as soluções levadas a temperatura de -20°C por 15 minutos. Após isto, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. e o sobrenadante transferido cuidadosamente para novos tubos. Após a transferência, foram adicionados um mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi agitado até formação de

precipitado visível. Realizou-se centrifugação a 13.000 r.p.m. por cinco minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% seguido de nova centrifugação (13.000 r.p.m. /5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi deixado à temperatura ambiente para secagem e em seguida re-suspenso em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

3.3.2- Investigação da mutação $\Delta F508$

A pesquisa dessa mutação foi realizada pela amplificação do fragmento de DNA alvo, utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que produz acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo. Indivíduos homozigotos normais apresentam como produto dois fragmentos de 50 pb. Por se tratar de uma deleção de três pb, indivíduos homozigotos mutantes, apresentam dois fragmentos de 47 pb. Indivíduos heterozigotos apresentam tanto o fragmento de 50 pb quanto o de 47 pb. Nos heterozigotos aparece ainda uma banda com migração mais tardia, referente aos heteroduplexes, ou seja, fragmentos de DNA formados por uma fita de 47pb e outra de 50pb (Figura 6).

Os iniciadores utilizados continham a seguinte sequência:

S: ggC ACC ATT AAA gAA AAT ATC

AS: CTA TAT TCA TCA Tag gAA AC

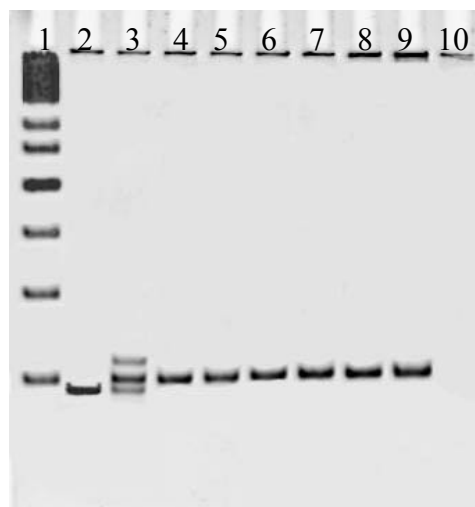


Figura 6- Eletroforese de gel de poliacrilamida a 12%: Na coluna um marcador de peso molecular de 50pb; Coluna dois controle homozigoto mutante 47pb; Coluna três – Controle heterozigoto 47pb, 50pb e heteroduplex; Colunas quatro a nove indivíduos homozigotos normais – 50pb. Coluna 18 controle negativo de reação.

A PCR teve volume final de 25 μ L, com a seguinte concentração de reagentes: 1,0 μ L de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 10mM; 0,5 μ L de cada iniciador concentração 10 μ mols/ μ L; dois unidades de Taq DNA polimerase; 1,0 μ L de MgCL2 50mM, 2,5 μ L de tampão da enzima polimerase (200mM Tris – HCL pH8,0), 1,0 μ L de DNA e 14,5 μ L de água de injeção.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 52,5°C (temperatura ideal para pareamento do iniciador) por 30 segundos e 72°C por um minuto para extensão. Após o término dos ciclos, houve uma extensão final de sete minutos a 72°C.

Os fragmentos de DNA amplificados pela PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida não desnaturante a 12%. Este gel possui volume final de 47,75 mL sendo 25,4 mL de H₂O Deionizada, 6mL de TBE 10X, 16 mL de Acrilamida 40%, 320 μ L Persulfato de amônio 10% e 35 μ L de Temed.

As condições da eletroforese foram de 147 Volts com duração de três a quatro horas em temperatura ambiente. Os resultados com os padrões das bandas foram visualizados através incidência de luz ultravioleta contra o gel impregnado com Brometo de Etídeo.

3.4- Cálculo de intervalo de confiança

Para cálculo do Intervalo de Confiança (IC), foi utilizada a fórmula para ocasiões de alguns portadores não detectados, descrita por Parker e Phillips (1994).

3.5- Caracterização dos pacientes

Uma minuciosa caracterização dos pacientes do ambulatório que serviram de base para os cálculos deste estudo está disponível no trabalho de Correia (2005).

3.6- Tipo de estudo

Estudo do tipo transversal retrospectivo.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as amostras coletadas na cidade de Campinas $n=694$ não foi encontrado nenhum alelo mutante 0/1.388.

Das 458 amostras coletadas em João Pessoa, em 14 amostras o DNA não pode ser extraído e elas foram descartadas da pesquisa, restando 444 amostras que tiveram o DNA extraído com sucesso. Tal fato ocorreu devido a possível falha no transporte do material biológico de João Pessoa para Campinas.

Dos 888 alelos analisados de João Pessoa, foram encontrados quatro alelos mutantes $Prev = 1/222$. ($p = 0,0045$)

A população brasileira é composta basicamente da mistura de três grupos étnicos: Europeus, Africanos e Indígenas. A parcela européia foi composta majoritariamente por portugueses, que começaram a colonização no século XVI e se espalharam por todo o país ao longo do tempo. Os africanos foram trazidos ao Brasil na época da escravidão, numa contínua migração forçada, que perdurou do século XVI ao século XIX, e predominantemente habitaram a faixa litorânea e o nordeste. Pouco antes do fim da escravidão, no final do século XIX, tiveram início novos movimentos migratórios, principalmente da Itália e Alemanha. Durante as três primeiras décadas do século XX, uma nova corrente migratória ocorreu, principalmente da Itália, Espanha e Portugal, se estabelecendo principalmente no Sudeste e Sul de nosso país. Após a segunda guerra mundial, o Brasil recebeu novos contingentes étnicos (japoneses, árabes, judeus, poloneses entre outros) aumentando assim a riqueza étnica deste país. (Cotrim, 1999; Vicentino e Dorino, 1997).

O alto grau de diversidade genética foi resultado da mistura destas etnias, com variações de acordo com cada região. Atualmente, o Brasil possui mais de 170 milhões de habitantes, sendo 87 milhões de mulheres e 83 milhões de homens. 54% dos brasileiros entrevistados no censo demográfico realizado em 2000 se declararam brancos, 38% se declararam pardos, 6% se declararam pretos, enquanto indígenas, amarelos e sem declaração somaram 2%. Estes dados, entretanto, possuem grandes variações quando observados isoladamente em regiões ou cidades. A tabela 6 demonstra esta variação percentual nas cidades de Campinas e João Pessoa. (Sistema IBGE de Recuperação

Automática - Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=7&i=P&c=2093>. Acesso em 08 de maio de 2007).

Ao analisarmos estes dados populacionais com dados da incidência da FC nos diversos grupos étnicos, poderemos esboçar cálculo da incidência da FC nestas cidades.

Tabela 6- Percentual da população residente por grupo étnico nos municípios de Campinas e João Pessoa

Grupo étnico	Campinas	João Pessoa
Branca	73,95	47,06
Parda	18,40	47,72
Preta	5,57	3,96
Amarela	0,95	0,13
Indígena	0,25	0,30
Sem declaração	0,89	0,83

4.1- Cálculo da incidência da fibrose cística

Para estimar o número real de heterozigotos em uma população, é necessário saber qual a proporção de alelos mutantes está sendo detectada. O índice de detecção deverá ser derivado do conhecimento das proporções alélicas das mutações entre pacientes com FC.

Com base nos dados de pacientes, onde 50% dos alelos contém a mutação $\Delta F508$, o cálculo da incidência da FC através da triagem desta mutação detectou apenas 50% dos heterozigotos da população. O número correto de heterozigotos deverá ser ajustado dividindo-se o número de heterozigotos encontrados na população pela frequência desta mutação entre pacientes.

Quando analisamos os dados colhidos da cidade de João Pessoa, com quatro heterozigotas encontradas em amostra de 444 mulheres saudáveis, isto nos dá frequência alélica de 0,0045. Com base nestes dados, e sabendo que a mutação $\Delta F508$ corresponde a aproximadamente 50% dos alelos de indivíduos com FC no Brasil, poderemos estimar a frequência dos alelos causadores da FC utilizando a proporção: $(0,0045/0,5)=0,0090$. Com isso, para a cidade de João Pessoa a incidência estimada desta doença autossômica recessiva é de 1:12.321 indivíduos (IC 95% - um em 10.877 a um em 14.204). Com frequência de portadores do alelo $\Delta F508$ em meio a população de 1/55,5 (IC95% 42,77 a 72,85).

$$\left(\frac{8}{888}\right)^2 = \frac{1}{12.321}$$

Esta incidência é similar a encontrada por afro-brasileiros, descrita por Raskin et al. (2007), entretanto difere, por exemplo, da encontrada na população do RS.

Por outro lado, devido ao fato de não termos encontrado nenhum heterozigoto entre as 694 mulheres da população da cidade de Campinas, não foi possível a execução de cálculo de incidência desta doença para esta cidade. Entretanto, podemos especular uma incidência mínima desta doença na população. Para efetuar tal cálculo, teremos que supor que foi encontrado um alelo nesta amostra. Isto nos levaria a frequência alélica de 1:1.388 ($q=0,0007204$). Sabendo que a mutação $\Delta F508$ corresponde a aproximadamente 50% dos alelos de indivíduos com FC no Brasil, novamente utilizamos a seguinte proporção. $(0,0007204/0,5)=0,0014409$. Com isso, para a cidade de Campinas obtivemos incidência mínima de 1:481.636. Este dado contradiz todos dados literários brasileiros sobre a incidência da FC. Se esta incidência fosse verdadeira, para a população de Campinas, iríamos ter apenas dois pacientes sob atendimento no ambulatório local.

Também não podemos descartar o fato de que para se efetuar cálculo de incidência de doença pela triagem de heterozigotos, é necessário que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, ausência de migração ou seleção preferencial. Já é consenso que eventos mutacionais novos são raros, entretanto a seleção preferencial de

heterozigotos ainda não está totalmente estabelecida. Como trabalhamos exclusivamente com mulheres em idade fértil, onde grande parte já eram mães, poderia ter ocorrido algum viés de coleta, já que mulheres com FC apresentam uma fertilidade reduzida em até 50%.

Apesar destes possíveis vícios ocultos, o resultado ainda foi surpreendente já que nenhum alelo foi encontrado em amostra tão expressiva na cidade de Campinas. Mesmo assim, este resultado para cidade de Campinas nos leva a crer que ao longo do tempo, houve intensa miscigenação na área periférica da cidade, reduzindo a prevalência de ancestrais com origem européia e com isso diminuindo a probabilidade de encontrarmos tal mutação.

Outro método para estimar a incidência da FC seria utilizar valores bem estabelecidos de outras amostras com os dados populacionais de cada cidade estudada. Para tanto, no caso dos caucasóides utilizaremos a incidência da FC em Portugal 1:3.500, para os negros e pardos utilizaremos a incidência de 1:17.000 e no caso de indígenas ou orientais, esta incidência poderá ser negligenciada devido a sua raridade. Desta forma, o cálculo da incidência da FC foi estimado de acordo com a distribuição étnica dessas cidades.

No caso de João Pessoa, 47% da população são de brancos, 51% de negros e pardos e apenas 2% de indígenas e orientais. Desta forma, o cálculo da incidência para esta cidade foi o seguinte:

$$\left(\frac{1}{3.500}\right)\left(\frac{47}{100}\right) + \left(\frac{1}{17.000}\right)\left(\frac{51}{100}\right) + \left(\frac{0}{1}\right)\left(\frac{2}{100}\right) \cong \frac{1}{6.087}$$

As duas incidências calculadas da FC para a cidade de João Pessoa estão em acordo com a literatura, apesar de ser mais de duas vezes menor que a outra.

Utilizando este mesmo método para a cidade de Campinas com os dados do IBGE, onde 74% da população são de brancos, 24% de negros e pardos e apenas 2% de indígenas e orientais. Desta forma, o cálculo da incidência para esta cidade foi o seguinte:

$$\left(\frac{1}{3.500}\right)\left(\frac{74}{100}\right) + \left(\frac{1}{17.000}\right)\left(\frac{24}{100}\right) + \left(\frac{0}{1}\right)\left(\frac{2}{100}\right) \cong \frac{1}{4.434}$$

Este resultado é mais coerente com os publicados anteriormente e com os dados ambulatoriais, quando comparado com o especulado em relação à amostra populacional.

Este resultado não difere dos dados literários, estando muito próximas de valores encontrados na Itália ou Portugal. É importante ressaltar que na época do estudo, dos 70 pacientes deste ambulatório, apenas três eram não caucasóides.

5- CONCLUSÕES

A partir da utilização dos dados ambulatoriais com os obtidos neste estudo, a incidência da FC em Campinas ficaria desprezível e em João Pessoa seria de 1/ 12.321.

Quando utilizamos o método de cruzamento de dados étnicos com dados literários da doença entre os diferentes grupos étnicos, na cidade de Campinas a prevalência ficaria em 1/ 4.434 e na cidade de João Pessoa ficaria 1/ 6.087.

O cálculo da incidência baseou-se na presença da mutação entre pacientes sintomáticos (com dois testes de suor alterados), o que envolve não só a mutação $\Delta F508$, mas levou em conta as outras mutações não encontradas. Entretanto, devido a grande heterogeneidade da doença, com doentes assintomáticos, não seria uma surpresa se a incidência encontrada neste estudo estivesse sub-estimada. Também é interessante ressaltar que entre os pacientes do ambulatório, existe uma predominância absoluta de caucasóides 94%, diferindo assim da amostra populacional estudada.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeliovich D, Lavon IP, Lerer I, Cohen T, Springer C, Avital A, et al. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am J Hum Genet* 1992; 51(5):951-6. PMID: 1384328.

Akata D, Akhan O. Liver manifestations of cystic fibrosis. *Eur J Radiol* 2007; 61(1):11-7. PMID: 17174503.

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: Características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J. Pediatr (Rio J)* 2004; 80:371-9.

Andersen HU, Lanng S, Pressler T, Laugesen CS, Mathiesen ER. Cystic fibrosis-related diabetes: the presence of microvascular diabetes complications. *Diabetes Care* 2006; 29(12):2660-3. PMID: 17130201.

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

Araujo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(1):11-5. PMID: 15665983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE APOIO A MUCOVISCIDOSE -ABRAM. Disponível em: <http://www.abram.gov.br>. Acesso em 02 de junho de 2007.

Barreto C, Marques Pinto L, Duarte A, Lavinha J, Ramsay M. A fertile male with cystic fibrosis: molecular genetic analysis. *J Med Genet* 1991; 28(6):420-1. PMID: 1870100.

Blau H, Livne M, Mussaffi H. Cystic fibrosis in adults: a changing scene. *Isr Med Assoc J* 2003; 5(7):491-5. PMID: 12901245.

Bobadilla JL, Macek JrM, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19(6):575-606. PMID: 12007216.

Bois E, Feingold J, Demenais F, Runavot Y, Jehanne M, Toudic L. Cluster of cystic fibrosis cases in a limited area of Brittany (France). Clin Genet. 1978; 14(2):73-6. PMID: 688690.

Brock DJH, Gilfillan A, Holloway S. The incidence of cystic fibrosis in Scotland calculated from heterozygote frequencies. Clin Genet 1998; 53(1):47-9. PMID: 9550361.

Bulitta JB, Duffull SB, Kinzig-Schippers M, Holzgrabe U, Stephan U, Drusano GL, et al. Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Piperacillin: Systematic Comparison of Cystic Fibrosis Patients and Healthy Volunteers. Antimicrob Agents Chemother. 2007. [Epub ahead of print] PMID: 17485505.

Cabello GM, Cabello PH, Otsuki K, Gombarovits ME, Llerena JC, Fernandes O. Molecular analysis of 23 exons of the CFTR gene in Brazilian patients leads to the finding of rare cystic fibrosis mutations. Hum Biol 2005; 77(1):125-35. PMID: 16114821.

Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena J. Cystic fibrosis: low frequency of DF508 mutation in two population samples from Rio de Janeiro, Brazil. Hum Biol 1999; 71(2):189-96. PMID: 10222642.

Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. Hum Genet 1997; 101(3):365-70. PMID: 9439669.

Cawood TJ, McKenna MJ, Gallagher CG, Smith D, Wen YC, Gibney J, et al. Oral bisphosphonates improve Bone Mineral Density in adults with cystic fibrosis. Ir Med J 2005; 98(9):270-3. PMID: 16300106.

Chakraborty R, Srinivasan MR, Raskin S. Estimation of the incidence of a rare genetic disease through a two-tier mutation survey. Am J Hum Genet 1993; 52(6):1129-38. PMID: 8503445.

Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, Massie J, McKay K, Gruca M. Pancreatic phenotype in cystic fibrosis patients identified by mutation screening. Arch Dis Child. 2007 Apr 20; [Epub ahead of print] PMID: 17449517

Cotrim GV. História Do Brasil - Um Olhar Crítico. Ed. Saraiva - didáticos; 1999. p. 384. ISBN: 8502029320.

Correia CA de A. Prevalência de seis mutações no gene cfr em portadores de fibrose cística na região de Campinas [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Cuppens H, Marynen P, De Boeck C, De Baets F, Eggermont E, Van den Berghe H. A child, homozygous for a stop codon in exon 11, shows milder cystic fibrosis symptoms than her heterozygous nephew. *J Med Genet*. 1990; 27(11):717-9. PMID: 2135388.

CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM- CFGAC. The Cystic fibrosis mutation database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr>. Acesso em 05 de junho de 2007.

Davies JC. New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2006; 7(1):141-3. PMID: 16798543.

De Rose V, Arduino C, Cappello N, Piana R, Salmin P, Bardessono M, et al. Fcgamma receptor IIA genotype and susceptibility to *P. aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2005; 3(1):96-101. PMID: 15367919.

de Vries HG, Collee JM, de Walle HE, van Veldhuizen MH, Smit Sibinga CT, Scheffer H, et al. Prevalence of delta F508 cystic fibrosis carriers in The Netherlands: logistic regression on sex, age, region of residence and number of offspring. *Hum Genet* 1997; 99(1):74-9. PMID: 9003498.

Derichs N, Schuster A, Grund I, Ernsting A, Stolpe C, Körtge-Jung S, et al. Homozygosity for L997F in a child with normal clinical and chloride secretory phenotype provides evidence that this cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation does not cause cystic fibrosis. *Clin Genet*. 2005; 67(6):529-31. PMID: 15857421.

Devoto M, De Benedetti L, Seia M, Piceni Sereni L, Ferrari M, Bonduelle ML, et al. Haplotypes in cystic fibrosis patients with or without pancreatic insufficiency from four European populations. *Genomics* 1989; 5(4):894-8. PMID: 2574150.

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12(5):549-63. PMID: 13111855.

Dörk T, El-Harith EH, Stuhmann M, Macek M, Egan M, Cutting GR, et al. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+1G-to-A in diverse populations. *Am J Hum Genet* 1998; 63(2):656-62. PMID: 9683582.

Estivill X, Bancglls C, Ramos D. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997; 10(2):135-54. PMID: 9259197.

European Working Group on CF Genetics: Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 1990; 85(4): 436-45. PMID: 2210767.

Evans AK, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of the meconius ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *Eur Resp J* 2001; 18(5):784-9. PMID: 11757628.

Farber S, Shwachman H, Maddock CL. Pancreatic function and disease in early life. I. Enzyme activity and the celiac syndrome. *J Clin Invest* 1943; 22(6):827-38. PMID: 16695067.

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronkiktasen. *Wien. Med Wochenschr* 1936; 86: 753-6.

Fields TM, Michel SJ, Butler CL, Kriss VM, Albers SL. Abdominal manifestations of cystic fibrosis in older children and adults. *Am J Roentgenol* 2006; 187(5):1199-203. PMID: 17056906.

Fischer H, Schwarzer C, Illek B. Vitamin C controls the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 9; 101(10):3691-6. PMID: 14993613.

Fitzsimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993; 122(1):1-9. PMID: 8419592.

Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M, Lenaerts C, Feingold J, Besmond C. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2001; 38(5):310-1. PMID: 11333866.

Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*. 1994; 266(5182):107-9. PMID: 7524148.

Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Høiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104:431-7. PMID: 10449435.

Gaskin KJ, Waters DL, Howman-Giles R, de Silva M, Earl JW, Martin HC, et al. Liver disease and common-bile-duct stenosis in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1988; 318(6): 340-6. PMID: 3340104.

Gasparini P, Nunes V, Savoia A, Dognini M, Morral N, Gaona A, et al. The search for south European cystic fibrosis mutations: identification of two new mutations, four variants, and intronic sequences. *Genomics* 1991; 10(1):193-200. PMID: 2045102.

Gentile VG, Isaacson G. Patterns of sinusitis in cystic fibrosis. *Laryngoscope* 1996; 106(8):1005-9. PMID: 8699890.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23(3):545-9. PMID: 13633369.

Goldbeck L, Zerrer S, Schmitz TG. Monitoring quality of life in outpatients with cystic fibrosis: Feasibility and longitudinal results. *J Cyst Fibros* 2007; 6(3):171-8. PMID: 16877050.

Goss CH, Burns JL. Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax* 2007; 62(4):360-7. PMID: 17387214.

Grebe TA, Seltzer WK, Demarchi J, Silva DK, Doane WW, Gozal D, et al. Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1994; 54(3):443-446. PMID: 7509564.

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21873-7. PMID: 10419506.

Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, Montrose-Rafizadeh C, Rosenstein BJ, Crystal RG. Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1991; 88(6):1880-5. PMID: 1721624.

Hansson GC. Cystic fibrosis and chloride-secreting diarrhea. *Nature*. 1988; 333(6175):711. PMID: 2455229.

Hodson ME. Treatment of cystic fibrosis in the adult. *Respiration* 2000; 67(6):595-607. PMID: 11124641.

Högenauer C, Santa Ana CA, Porter JL, Millard M, Gelfand A, Rosenblatt RL, et al. Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet*. 2000; 67(6):1422-7. PMID : 11055897.

Hubert D, Patrat C, Guibert J, Thiounn N, Bienvenu T, Viot G, et al. Results of assisted reproductive technique in men with cystic fibrosis. *Hum Reprod* 2006; 21(5):1232-6. PMID: 16431902.

Jorde LB, Vary JCC, Bamshad MJ & White RL. *Genética médica*. 2^aed., Rio de Janeiro, RJ, Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *New Eng J Med* 1968; 279(2):65-9. PMID: 5657013.

Kerem E. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev*. 2006; 7S:S166-9. PMID: 16798551.

Kerem E, Kalman YM, Yahav Y, Shoshani T, Abeliovich D, Szeinberg A, et al. Highly variable incidence of cystic fibrosis and different mutation distribution among different Jewish ethnic groups in Israel. *Hum. Genet* 1995; 96(2):193-7. PMID: 7635469.

Kulczycki LL, Kostuch M, Bellanti JA. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet A* 2003; 116(3):262-7. PMID: 12503104.

Lerer I, Sagi M, Cutting GR, Abeliovich D. Cystic fibrosis mutations Δ F508 and G542X in Jewish patients. *J Med Genet* 1992; 29(2):131-3. PMID: 1377276.

Loirat, F.; Hazout, S.; Lucotte, G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum. Biol* 1997; 69:419-25. PMID: 9164051.

Lowe CU, May CD, Reed SC. Fibrosis of the pancreas in infants and children: a statistical study of clinical and hereditary features. *Am. J. Dis. Child.* 78: 349-374, 1949.

Lucotte G, Hazout S, De Braekeleer M. Complete map of cystic fibrosis mutation Δ F508 frequencies in Western Europe and correlation between mutation frequencies and incidence of disease. *Hum Biol* 1995; 67(5):797-803. PMID: 8543293

MacLusky I, McLaughlin FJ, Levison H. Cystic fibrosis: Part 1. *Curr Probl Pediatr.* 1985; 15(6):1-49. PMID: 3891236.

Macri CN, De Gentile AS, Manterola A, Tomezzoli S, Reis FC, Largo Garcia I, et al.: Epidemiology of cystic fibrosis in Latin America: preliminary communication. *Pediatr Pulmonol.* 1991; 10(4):249-53, 1991. PMID: 1896232.

Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics.* 1994;40(1):37-44. PMID: 8206524.

Martins CS, Ribeiro F, Costa FF. Frequency of the cystic fibrosis delta F 508 mutation in a population from Sao Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26(10):1037-40. PMID: 8312835.

McCormick J, Conway SP, Mehta A.: Paediatric Northern Score centile charts for the chest radiograph in cystic fibrosis. *Clin Radiol* 2007; 62(1):78-81. PMID: 17145268.

Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis. *Med Clin* 2000; 84(3):597-607. PMID: 10872417.

de Miranda AB, Llerena Junior J, Dallalana LT, Moura-Neto RS, Suffys PN, Degraive WM. Use of PCR for the determination of the frequency of the delta F508 mutation in Brazilian cystic fibrosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88(2):309-12. PMID: 8107592

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994; 7(2):169-75. PMID: 7920636.

Munck A, Gerardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg* 2006; 41(9):1556-60. PMID: 16952591.

Nam MH, Hijikata M, Tuan le A, Lien LT, Shojima J, Horie T, et al. Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. *Am J Med Genet A* 2005; 136(3):249-53. PMID: 15948196.

Neglia JP, FitzSimmons SC, Maisonneuve P, Schoni MH, Schoni-Affolter F, Corey M, et al. The risk of cancer among patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis and Cancer Study Group. *New Eng J Med* 1995; 332(8):494-99. PMID: 7830730.

Okay TS, Oliveira WP, Raiz-Junior R, Rodrigues JC, Del Negro GM. Frequency of the deltaF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics* 2005; 60(2):131-4. PMID: 15880249.

Oppenheimer EA, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM. Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynec* 1970; 108(4):673-4. PMID: 5505999.

Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dork T, McIntosh I, et al. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 1992; 89: 653-58. PMID : 1380943.

Padoa C, Goldman A, Jenkins T, Ramsay M. Cystic fibrosis carrier frequencies in populations of African origin. *J Med Genet*. 1999; 36(1):41-4. PMID: 9950364.

Parizotto EA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF. Molecular characterisation of cystic fibrosis patients in the state of São Paulo (Brazil). *J Med Genet* 1997; 34(10):877. PMID: 9350831.

Parker RA, Phillips JA III. Population screening for carrier status: effects of test limitations on precision of carrier prevalence rates. *Am J Med Genet*. 1994 Feb 1;49(3):317-22. PMID: 8209893.

Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, et al. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. Nature 1998; 393(6680):79-82. PubMed ID : 9590693

Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. Science 1996; 271(5245):64-7. PMID: 8539601.

Quint A, Lerer I, Sagi M, Abeliovich D. Mutation spectrum in Jewish cystic fibrosis patients in Israel: implication to carrier screening. Am J Med Genet A 2005; 136(3):246-8. PMID: 15948195.

Quinzii C, Castellani C. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. J Endocrinol Invest 2000; 23(10):684-9. PMID: 11097434.

Radpour R, Gourabi H, Sadighi Gilani MA, Vosough Dizaj A. Molecular Study of (TG)m(T)n Polymorphism in Iranian Males with Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. J Androl 2007 Feb 21- [Epub ahead of print]. PMID: 17314234.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. J Cyst Fibros 2007 [Epub ahead of print] PMID: 17544945

Reis FJC, Camargos PAM, Rocha S. de F.; Survival analysis for cystic fibrosis in Minas Gerais State, Brazil. J Trop Pediatr 1998; 44(6):329-31. PMID: 9972073.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989; 245(4922):1066-73. PMID: 2475911.

Robinson P. Pediatric origins of adult lung disease: Cystic Fibrosis. Thorax 2001; 56(3):237-41. PMID: 11182019.

Rodman DM, Zamudio S. The cystic fibrosis heterozygote--advantage in surviving cholera? Med Hypotheses 1991; 36(3):253-8. PMID: 1724059.

Romeo G, Devoto M, Galletta LJ. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? Hum Genet. 1989; 84(1):1-5. PMID: 2691388.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245(4922): 1059-65. PMID: 2772657.

Russo MP, Romeo G, Devoto M, Barbujani G, Cabrini G, Giunta A. Analysis of linkage disequilibrium between different cystic fibrosis mutations and three intragenic microsatellites in the Italian population. Hum Mutat 1995; 5(1):23-7. PMID: 7537148.

Scotet V, Gillet D, Duguépérroux I, Audrézet MP, Bellis G, Garnier B, et al. Spatial and temporal distribution of cystic fibrosis and of its mutations in Brittany, France: a retrospective study from 1960. Hum Genet. 2002; 111(3):247-54. PMID: 12215837.

Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, Rivlin Y, et al. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. Am J Hum Genet 1992; 50: 222-8. PMID : 1370365.

Sistema IBGE de Recuperação automática – Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=cd&o=7&i=P&c=2093>. Acesso em 08 de maio de 2007.

Siraganian PA, Miller RW, Swender PT. Cystic fibrosis and ileal carcinoma. Lancet 1987; 2(8568):1158. PMID: 2890063.

Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. New Eng J Med 1998; 339(10):645-52. PMID: 9725921.

St Denis M, Ramotar K, Vandemheen K, Tullis E, Ferris W, Chan F, et al.: Infection with Burkholderia cepacia complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. Chest 2007; 131(4):1188-96. PMID: 17426227.

Stanke F, Becker T, Cuppens H, Kumar V, Cassiman JJ, Jansen S, et al. The TNF-alpha receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis. Hum Genet 2006; 119(3):331-343. PMID: 16463024.

van de Vosse E, Ali S, de Visser AW, Surjadi C, Widjaja S, Vollaard AM, et al. Susceptibility to typhoid fever is associated with a polymorphism in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Hum Genet* 2005; 118(1):138-40. PubMed ID : 16078047.

Vicentino C, Dorigo G. *História do Brasil*. Ed. Scipione. 1997; p. 496. ISBN: 8526232029.

Wagener DK, Cavalli-Sforza LL. Ethnic Variation in Genetic Disease: Possible Roles of Hitchhiking and Epistasis. *Am J Hum Genet* 1975; 27:348-64. PMID: 803016.

Wang XF, Zhou CX, Shi QX, Yuan YY, Yu MK, Ajonuma LC, et al. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol* 2003; 5(10):902-6. PMID: 14515130

WELSH, M, J., TSUI, L. C., BOAT, T. F., BEA, A. Cystic fibrosis. In: *The metabolic and molecular bases of inkerites disease*. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (eds); New York, 7th end. Mc Graw. Hill, 1995, p.3799-3876.

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

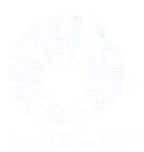
Woodworth BA, Ahn C, Flume PA, Schlosser RJ. The delta F508 mutation in cystic fibrosis and impact on sinus development. *Am J Rhinol*. 2007 Jan-Feb;21(1):122-7. PMID: 17283574.

Wu CC, Alper OM, Lu JF, Wang SP, Guo L, Chiang HS, Wong LJ. Mutation spectrum of the CFTR gene in Taiwanese patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*. 2005; 20(9):2470-5. PMID: 15905293.

Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29:777-807. PMID: 8825494.

Zuckerman JB, Seder DB. Infection control practice in cystic fibrosis centers. *Clin Chest Med* 2007; 28(2):381-404. PMID: 17467555.

7- ANEXOS



ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 23/08/05.

(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 180/2005

CAAE: 0027.0.000.146-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO $\Delta F508$ DA FIBROSE CÍSTICA EM UMA AMOSTRA POPULACIONAL”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Leonardo Vicentini Arruda

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 27/04/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/01/06 e 23/07/06

II - OBJETIVOS

Investigar a prevalência da mutação $\Delta F508$ da FC em aproximadamente 1.100 mulheres em idade fértil.

III - SUMÁRIO

A fibrose cística (FC) ou mucoviscidose é a doença genética mais encontrada nas populações europeias afetando 1 em 2500 nascidos vivos. A incidência da fibrose cística varia conforme a população estudada, inclusive dentro de um mesmo grupo étnico. O gene responsável por esta doença localiza-se no braço longo do cromossomo 7, na região 31.2 e codifica uma proteína transmembrana reguladora da condutância iônica chamada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), que possui 1480 aminoácidos, com uma massa molecular de 168 Kda. As mutações no gene CFTR estão relacionadas com a FC devido a produção de uma proteína anômala, resultando em um fluxo de condução de íons defeituoso na membrana plasmática de células epiteliais. O quadro clínico dos indivíduos portadores de FC é heterogêneo, caracterizado principalmente pelo transporte defeituoso de sódio e cloretos nas células exócrinas dos pulmões, pâncreas e glândulas sudoríparas, resultando em uma insuficiência pulmonar e pancreática crônicas, assim como um aumento da concentração de cloretos no suor. Devido a expressão clínica variável e na grande quantidade de óbitos sem diagnóstico, torna-se necessário um levantamento preciso da prevalência da mutação $\Delta F508$ no nosso país, já que até agora os estudos realizados em pacientes tem determinado a ocorrência e não a prevalência da doença na população. O objetivo deste trabalho será a investigação da prevalência da mutação $\Delta F508$ em uma amostra da população composta por aproximadamente 1100 mulheres em idade fértil, de diferentes grupos étnicos, que participaram voluntariamente de outro projeto de pesquisa na área genética. O método utilizado para identificar a mutação $\Delta F508$

no gene CFTR será a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os dados serão inseridos em um banco através do Excel e a seguir serão realizadas análises estatísticas apropriadas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto é relevante, pois busca determinar a ocorrência e incidência da FC através de triagem de parte da população procedente de uma região periférica da cidade de Campinas, sendo possível uma posterior comparação com pacientes já diagnosticados como fibrocísticos e que realizam acompanhamento ambulatorial. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido explica pormenorizadamente sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos e benefícios previstos, garantindo a liberdade do sujeito em recusar-se a participar da pesquisa e também do sigilo dos participantes. Como já solicitado anteriormente, o estudo anterior citado (protocolo 236/2004) não foi coordenado pelo pesquisador responsável, o que demanda por escrito dos coordenadores liberando o uso do referido material.

Recomendação: Anexar ao projeto autorização dos coordenadores do estudo citado (protocolo 236/2004) liberando o uso do material biológico.

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, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

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

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

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de julho de 2005.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2

NÍVEIS DE ÁCIDO FÓLICO EM MULHERES EM IDADE REPRODUTIVA ANTES E APÓS O ENRIQUECIMENTO DAS FARINHAS DE MILHO E TRIGO

CIDADE {ID}ENTIFICAÇÃO:< >

1.{Núm}ero do {quest}ionário: 2.{Data} <dd/mm/yyyy>

3.{C}entro de {S}aúde:< >

4.{Nome} do entrevist{ador}:< >

5.{Nome} da entrevist{ada}:< >

6.{N}úmero de {matr}ícula no {CS}:< >

7.Quantos {anos} a Sra tem?

8.A Sra.tem ou teve filho com {def}eito de {nasc}ença? # Qual? < >

9.A Sra.sabe {ler} e {escr}ever?

10.A Sra.{freq}uenta atualmente {esc}ola ou curso?

11.Qual a {últ}ima {serie} ou período concluído com aprovação?

12.Endereço:

{Rua1}:< > {Núm}ero{1}:

{Compl}emento{1}: < > {Bairro{1}: < >

{CEP1}: {Ref}erencia: < >

{Tel}s. para contato:{res}. {Cel}:

{Tel}{trab}: {Outro}s {tel}:

13.A Sra. vai continuar morando no seu endereço atual durante os próximos 12 meses ou {pret}ende {mudar}-se?

{Rua2}: < > {Num}ero{2}:

{Bairro{2}: < > {Município}: < >

14.A Sra. pode me dar outro endereço e telefone de uma pessoa da família ou amigo caso eu não consiga localizá-la?

{Nome3}: < >

{Rua3}: < > {Núm}ero{3}:

{Compl}emento{3}: < > {Bairro{3}: < >

{Cep3}: {Tel}:

15.A Sra. esta usando alguma {vitamina}? Qual? < >

16.A Sra. usa {anticoncep}cional? 17.Que {tipo}? {Nome}: < >

18.{Quant}as vezes a senhora ja {engr}avidou? vezes

19.A Sra. ja teve algum {aborto} espontaneo? {Quantos}?

20.A Sra. teve algum bebe que {nasc}eu {morto}? {Por que}? < >

21.Qual a {idade} do seu {filh}o mais novo? ____anos ou ____meses ou ____dias

22.Qual a {data} de {nasc}imento dele? <dd/mm/yyyy>

As perguntar 23 até 26 são para mães de crianças com até dois anos de idade.

23.A Sra. esta {amament}ando?

24.Além do peito, a Sra. oferece ao seu filho:

24.1.{Água} 24.2.{Chá} 24.3.{Suco}

24.4.{outro leite} 24.5.{outro alim}ento

25.Da hora que seu filho acorda até a hora de dormir {quant}as vezes ele{mama}? vezes

26.Seu filho {mama} durante a {noite}? {Quant}as vezes?

27.A Sra. {fuma}? {Quant}os {cig}arros por dia?

{Outro} tipo de {fumo}: < >

28.Agora vou fazer umas perguntas sobre o uso que a Sra.faz de alguns alimentos:

28.1.{Arroz} 28.2.{Cereais} matinais 28.3.{Macarrão}

28.4.{Pão}	28.5.{Bolachas}, biscoitos, bolos	
28.6.{Milho}	28.7.{Batata}	28.8.{Mandioca}
28.9.{Leite}	28.10.{Queijo}	28.11.{Iogurte}
28.12.{Requeijão}	28.13.{Margarina}	28.14.{Ovos}
28.15.{Legumes}	28.16.{Beterraba}	28.17.{Alface}
28.18.{Espinafre}	28.19.{Abacate}	28.20.{Laranja}
28.21.{Frutas}	28.22.{Feijão}	28.23.{Lentilha}
28.24.{Fígado}	28.25.{Carne}	28.26.{Salsicha}
28.27.{Açúcar}	28.28.{Doces}	
28.29.{Refri}gerantes	28.30.Bebidas {álcool}icas	28.31.{Café}

Características de Segurança Alimentar

Na sua casa {mora} alguém com menos de {20} anos de idade?

{M3Q1} Teve preocupação de que a comida na sua casa acabasse

{M3Q2} Frequência

{M3Q3} A comida acabou antes que a Sra.tivesse dinheiro para comprar

{M3Q4} Frequência

{M3Q5} Ficou sem dinheiro para ter uma alimentação saudável e variada

{M3Q6} Frequência

{M3Q7} Teve que se arranjar com apenas alguns alimentos

{M3Q8} Frequência

{M3Q9} Não pode oferecer uma alimentação saudável

{M3Q10} Frequência

{M3Q11} Algum morador de sua casa com menos 20 anos não comeu quant.suficiente

{M3Q12} Frequência

{M3Q13} Algum adulto em sua casa diminuiu a quant. de alimentos

{M3Q14} Frequência

{M3Q15} Alguma vez comeu menos do que achou que devia

{M3Q16} Frequência

{M3Q17} Alguma vez sentiu fome mas não comeu

{M3Q18} Frequência

{M3Q19} Perdeu peso

{M3Q20} Quantidade de peso que perdeu foi:

{M3Q21} Ficou um dia inteiro sem comer

{M3Q22} Frequência

{M3Q23} Alguma vez diminuiu a quantidade de alimentos

{M3Q24} Frequência

{M3Q25} Teve que deixar de fazer alguma refeição

{M3Q26} Frequência

{M3Q27} Algum morador com menos de 20 anos teve fome

{M3Q28} Frequência

{M3Q29} Algum morador com menos de 20 anos ficou sem comer

{M3Q30} Frequência

Observações: <

>

HEMOGRAMA

SÉRIE VERMELHA

{Eritr}ócitos		milhoes/mm3
{H}emoglo{b}ina		g/dl
{H}ematocri{to}		%
V.C.M.	u3	
H.B.C.M		uug
C.H.B.C.M		%
RDW		%

SÉRIE BRANCA

{Leucó}citos		/mm3
{Met}a-{pro}-{mie}lo	%	
{Bast}onetes		%
{Seg}mentados	%	
{Eosinof}ilos		%
{Basof}ilos		%
{Linf}ocitos		%
{Monoc}itos		%

Plaquetas /mm3

{FERRIT}INA ng/ml

AF sérico

{AF eritr}ocitário