

ELISANGELA JACINTO DE FARIA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS
POLIMORFISMOS DOS GENES:**

MBL2, TGF- β 1 E CD14 com a gravidade do quadro pulmonar
na fibrose cística

CAMPINAS

2007

ELISANGELA JACINTO DE FARIA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS
POLIMORFISMOS DOS GENES:**

MBL2, TGF-B1 E CD14 com a gravidade do quadro pulmonar
na fibrose cística

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em
Ciências Biomédicas*

ORIENTADOR: CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2007

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

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

F225i	Faria, Elisangela Jacinto de Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: MBL2, TGF-β1 e CD14 com a gravidade do quadro pulmonar na fibrose cística / Elisangela Jacinto de Faria. Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Fibrose cística. 2. Polimorfismos (Genética). 3. Modificador genético. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	---

**Título em inglês : Investigation of the association between polymorphisms of
MBL2,TGFB1 and CD4 genes with lung disease severity in cystic fibrosis**

Keywords: • Cystic fibrosis
• Polymorphisms
• Gene Modifier

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Doutorado em Ciências Médicas

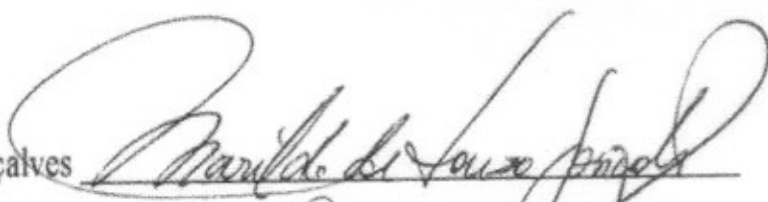
**Banca examinadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Profa. Dra. Vera Lúcia da Silva Lopes**

Data da defesa: 28-02-2007

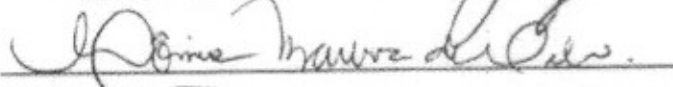
Banca examinadora da tese de Doutorado

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

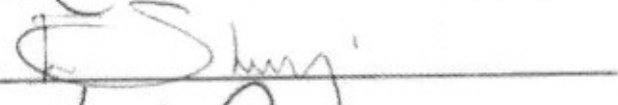
Prof.(a) Dr.(a) Marilda de Souza Gonçalves



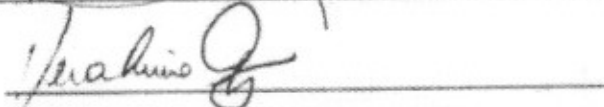
Prof.(a) Dr.(a) Mônica Barbosa de Mello



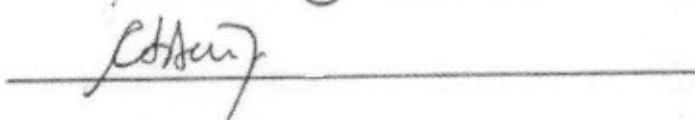
Prof.(a) Dr.(a)) Carmen Silyvia Passos Lima



Prof.(a) Dr.(a) Vera Lúcia Gil da Silva Lopes



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



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

Data: 28/02/2007

2007237712

DEDICATORIA

Aos meus pais Eurides e Neide

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo carinho e compreensão

Á minha irmã Isabel, pela paciência, união e convivência no laboratório

Á Carmen, pela atenção e confiança

Aos estagiários João Paulo, Cris, Catarina, Márcia e Vanessa pela ajuda no laboratório. E também ao pessoal do Anglo, principalmente a Natália e Renata, sempre dispostas a aprender e ajudar

Agradeço a Madalena (Madá), pela amizade, dedicação, pela excelente extração de DNA dos pacientes controles desse projeto

Aos amigos Lilian, Daniela, Lidiane, Lucila, Estela e Renato pelas alegrias, convivência agradável e as brincadeiras, no laboratório

Á todos os colegas do laboratório, pelo respeito e atenção

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xxxi</i>
ABSTRACT.....	<i>xxxv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	39
1.1- Histórico da Fibrose Cística.....	41
1.2- Características clínicas da Fibrose Cística.....	42
1.3- O gene da Fibrose Cística e a proteína CFTR.....	44
1.4- Mutação do gene CFTR.....	47
1.5- Correlação genótipo-fenótipo.....	48
1.6- Genes modificadores na Fibrose Cística.....	51
1.7- MBL - Lectina ligadora da manose.....	52
1.7.1- A estrutura da MBL.....	54
1.7.2- Manose associada a serina de proteases.....	54
1.7.3- A biologia molecular da MBL.....	56
1.7.4- Produção no sítio da MBL.....	61
1.7.5- Deficiência da MBL e suas repercussões clínicas.....	61
1.8- TGFβ- (Fator de crescimento e transformação - β).....	62
1.8.1- Polimorfismo genético para TGFβ1.....	64
1.8.2- Expressão de TGFβ no pulmão.....	65
1.8.3- A função de TGFβ na patogenia da doença pulmonar.....	66
1.8.4- O tecido brônquico danificado na FC.....	66
1.8.5- Fatores de crescimento na Fibrose Cística.....	67

1.9- CD14.....	68
1.9.1- A função do gene CD14.....	68
1.9.2- O gene CD14.....	69
2- OBJETIVOS.....	71
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	75
3.1- MBL2.....	80
3.2- TGF – β1.....	90
3.3- CD14.....	93
3.4- Escore de Shwachman.....	95
3.5- Análise dos dados.....	95
4- RESULTADOS.....	97
5- DISCUSSÃO.....	113
6- CONCLUSÃO.....	119
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
8- ANEXOS.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

FC	Fibrose Cística
CFTR	Proteína reguladora de condutância transmembranana da Fibrose Cística
NBF	Dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP
MBL	Lectina ligadora da manose
MASP	Sistema serino protease associada à MBL
TGF-β	Fator de crescimento e transformação - β
LPS	Lipopolissacarídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
SSP	Seqüência de primers específicos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Kb	Kilobases
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
TBE	Tampão Tris - Borato – EDTA
bp	Pares de bases
ES	Escore de Shwachman
ARMS	Sistema de mutação refratário à amplificação

	PÁG.
Tabela 1- Frequências dos haplótipos de MBL2 em 6 populações brasileiras, comparadas com outras populações.....	60
Tabela 2- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e os alelos A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene <i>MBL2</i>	99
Tabela 3- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e genótipo A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene <i>MBL2</i>	99
Tabela 4- Distribuição dos alelos A e 0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene <i>MBL2</i> por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.....	100
Tabela 5- Distribuição da frequência genotípica A0 do gene <i>MBL2</i> por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.....	100
Tabela 6- Distribuição genotípica A0 do gene <i>MBL2</i> por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.....	100
Tabela 7- Associação dos alelos da mutação $\Delta F508$ e os alelos da região promotora do gene <i>MBL2</i>	101
Tabela 8- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e genótipos da região promotora do gene <i>MBL2</i>	101
Tabela 9- Comparação da presença de um e dois alelos para $\Delta F508$ em relação à ausência de alelo quanto aos genótipos da região promotora do gene <i>MBL2</i>	102
Tabela 10- Distribuição alélica da região promotora do gene <i>MBL2</i> por gravidade do quadro pulmonar.....	102

Tabela 11-	Distribuição da frequência genotípica dos alelos presentes na região promotora do gene <i>MBL2</i> por gravidade do quadro pulmonar.....	103
Tabela 12-	Distribuição genotípica dos polimorfismos presentes na região promotora do gene <i>MBL2</i> , separados por gravidade do quadro pulmonar em leve e moderada com relação a quadro pulmonar grave.....	103
Tabela 13-	Comparação da frequência alélica do polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i> em pacientes fibrocísticos e o grupo controle.....	104
Tabela 14-	Comparação genotípica dos pacientes fibrocísticos e grupo controle para o polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i>	104
Tabela 15-	Comparação da presença da mutação $\Delta F508$ quanto ao polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i>	105
Tabela 16-	Distribuição da frequência alélica por gravidade do quadro pulmonar quanto ao polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i>	105
Tabela 17-	Distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i> quanto à gravidade do quadro pulmonar.....	106
Tabela 18-	Comparação da distribuição genotípica do quadro pulmonar leve com o grupo controle quanto ao polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i>	106
Tabela 19-	Distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene <i>TGFB1</i> , quanto ao quadro pulmonar.....	106
Tabela 20-	Comparação da frequência alélica do polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i> dos pacientes e grupo controle.....	107
Tabela 21-	Comparação genotípica das amostras dos pacientes e grupo controle para o polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i>	107

Tabela 22-	Associação entre os alelos da mutação $\Delta F508$ e os genótipos do polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i>	108
Tabela 23-	Distribuição da frequência alélica do polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i> e a gravidade do quadro pulmonar nos pacientes fibrocísticos.....	108
Tabela 24-	Distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i> entre os indivíduos controle e a gravidade da doença nos fibrocísticos.....	109
Tabela 25-	Distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene <i>CD14</i> em pacientes fibrocísticos quanto ao quadro pulmonar leve e moderado versus pulmonar grave.....	109
Tabela 26-	Presença dos alelos $\Delta F508$ e a gravidade do quadro pulmonar nos pacientes fibrocísticos.....	110
Tabela 27-	Comparação da presença de um alelo $\Delta F508$, com relação à presença de dois alelos $\Delta F508$, quanto à gravidade do quadro pulmonar.....	110
Tabela 28-	Comparação da presença de dois alelos $\Delta F508$, com relação à ausência do alelo $\Delta F508$, quanto à gravidade do quadro pulmonar.....	111

	PÁG.
Figura 1- Representação da localização do gene <i>CFTR</i> no cromossomo 7, região q.31.....	44
Figura 2- Representação da estrutura da proteína cfr na membrana celular..	46
Figura 3- Representação esquemática da deleção de três pares de bases no gene da <i>CFTR</i> , correspondendo à mutação $\Delta F508$	47
Figura 4- Esquematização celular das 5 classes de mutações na Fibrose Cística.....	49
Figura 5- Variantes genéticos múltiplos na doença mendeliana e na doença não mendeliana.....	52
Figura 6- Representação esquemática da via das lectinas de ativação do complemento.....	56
Figura 7- Representações esquemática do gene <i>MBL2</i> e das mutações do éxon 1, formando os alelos variáveis B, C e D e na região promotora do gene, os alelos H/L e X/Y.....	58
Figura 8- Polimorfismo +869 (T-C), localizado no códon 10 do éxon 1 do gene <i>TGF-β1</i>	65
Figura 9- Fatores de crescimento na matriz extracelular.....	67
Figura 10- Localização do polimorfismo (C-159T) na região promotora do gene <i>CD14</i>	70
Figura 11- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 52 + 223 D...	84
Figura 12- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 54 + 230 B...	85

Figura 13-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 57 + 239 C...	86
Figura 14-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo H (- 550) na região promotora do gene <i>MBL2</i>	87
Figura 15-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo L (- 550) na região promotora do gene <i>MBL2</i>	88
Figura 16-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo X (- 221) na região promotora do gene <i>MBL2</i>	89
Figura 17-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo Y (- 221) na região promotora do gene <i>MBL2</i>	90
Figura 18-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo C do polimorfismo T869C no gene <i>TGF-β1</i>	92
Figura 19-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo T do polimorfismo T869C no gene <i>TGF-β1</i>	93
Figura 20-	Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos digeridos pela enzima <i>AvaII</i> , na reação de investigação da análise do polimorfismo C-159T do gene <i>CD14</i>	94

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do ambulatório de Fibrose Cística do departamento de Pediatria da Unicamp, segundo o gênero.....	78
Gráfico 2- Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do Ambulatório de Fibrose Cística do departamento de Pediatria da Unicamp, segundo o grupo racial.....	78
Gráfico 3- Distribuição do grupo controle composto por indivíduos doadores de sangue da Unicamp, quanto ao grupo racial.....	79
Gráfico 4- Distribuição do grupo controle composto por indivíduos doadores de sangue da Unicamp, quanto ao gênero.....	80

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Polimorfismos no éxon 1 do gene <i>MBL2</i> , representados pelos seguintes genótipos: AA - indivíduo normal; AO – indivíduo heterozigoto; OO - indivíduo homozigoto ou heterozigoto composto.....	83

RESUMO

A Fibrose Cística é uma alteração genética que cursa principalmente com manifestações pulmonares e pancreáticas. A correlação genótipo-fenótipo da fibrose cística é motivo de árduos estudos. Somente a correlação com a insuficiência pancreática foi encontrada. Percebeu-se, também, que o curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão correlacionados com o genótipo CFTR. A doença pulmonar pode ser influenciada por fatores ambientais e por fatores genéticos. Genes modificadores podem influenciar na gravidade do fenótipo dos fibrocísticos através de vários mecanismos. O objetivo desse projeto foi analisar alguns genes modificadores, *MBL2*, *TGFB1* e *CD14*, e correlacionar com a gravidade do quadro pulmonar dos fibrocísticos. Verificar a presença dos alelos $\Delta F508$ e a gravidade do quadro pulmonar nos paciente fibrocísticos. A análise de polimorfismos no gene *MBL2* e no gene *TGF- β 1* no códon 10 na posição + 869, foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase alelo específica. A genotipagem do polimorfismo C-159T, no gene *CD14* foi realizada através da reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática. Em nossa casuística, os polimorfismos do gene *MBL2* não foram associados com a gravidade do quadro pulmonar em pacientes fibrocísticos. Com relação ao polimorfismo T869C no gene *TGFB1*, encontramos apenas associação do heterozigoto TC com quadro pulmonar leve ($P=0,04$). Para o polimorfismo C-159T no gene *CD14*, obtivemos um predomínio de pacientes com o genótipo TT ($P=0,0009$), mas não houve discriminação com relação à gravidade do quadro pulmonar. Com isso concluímos que houve uma associação entre o genótipo TC do polimorfismo T869C (*TGF- β 1*) e o quadro pulmonar leve nos fibrocísticos. Com relação ao gene *CD14*, o genótipo TT parece ser um fator de risco para o quadro pulmonar, mas não um fator modulador da gravidade. Em nossa casuística, não existiu associação entre pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$ e a gravidade do quadro pulmonar.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is a genetic alteration characterized mainly by pancreatic and pulmonary manifestations. The genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis has been the subject of arduous studies. A correlation between cystic fibrosis and pancreatic insufficiency, as well as to the fact that the occurrence and severity of pulmonary manifestations are not correlated with CFTR genotype, has been observed. Pulmonary illness can be influenced by environmental and genetic factors. Modifier genes can influence the phenotype severity of patients with cystic fibrosis through some mechanisms. The objective of this study was to analyze some modifier genes, such as *MBL2*, *TGFB1* and *CD14*, and to correlate them with the gravity of the pulmonary picture of patients with cystic fibrosis and to also verify the presence of the alleles $\Delta F508$ and the gravity of the pulmonary picture in these patients. The analysis of *MBL2* and *TGF- β 1* gene polymorphisms at codon 10, in the position + 869, was carried out using the technique of allele-specific polymerase chain reaction. The genotyping of the CD14/-159 polymorphism was performed by polymerase chain reaction and enzymatic digestion. In our casuistic, the polymorphism of the *MBL2* gene was not associated with the gravity of the pulmonary picture in patients with cystic fibrosis. Regarding the T869C polymorphism in the *TGFB1* gene, we found only an association of heterozygote TC with a mild pulmonary picture ($P=0,04$). In the C-159T polymorphism of the CD14 gene, we observed an accumulation of patients with genotype TT ($P=0,0009$), but did not have a discrimination regarding the gravity of the pulmonary picture. Therefore we concluded that there was an association between the genotype TC of the T869C polymorphism (TGF- β 1) and the mild pulmonary picture in the patients with cystic fibrosis. Regarding the CD14 gene, the TT genotype seems to be a risk factor for the pulmonary picture, but not a gravity modulating factor. In our casuistic, we found no association between $\Delta F508$ homozygote patients for the mutation and the gravity of the pulmonary picture.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico da Fibrose Cística

Os conhecimentos de fisiopatologia e epidemiologia da Fibrose Cística foram progressivamente conhecidos no século XX. Landsteiner (1905) realizou a primeira descrição anatomopatológica da FC em recém-nascidos falecidos no quinto dia de vida por íleo meconial. Fanconi et al. (1936) descreveram o caso de uma criança com alterações pancreáticas e que apresentava sintomas pulmonares e intestinais.

Em 1938, Andersen, formulou a hipótese da etiologia da doença e propôs uma padronização de seu tratamento, tornando a doença conhecida nos países de língua inglesa. Esta publicação é considerada um marco no estudo da Fibrose Cística. Posteriormente, Farber (1945) notou que os pacientes com Fibrose Cística sofriam de obstrução causada por muco em uma série de órgãos, e propôs a hipótese de que o muco espesso era consequência de estímulo excessivo parassimpático e que a secreção anômala assim produzida era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas, designando pela primeira vez o termo “mucoviscidose.” Nesse período, Anderson & Hodges (1946) sugeriram o padrão autossômico recessivo de herança da doença. Em 1953, di Sant' Agnese et al. pesquisaram a depleção de sal em crianças com fibrose cística durante uma onda de calor no verão; eles concluíram que a perda excessiva de sal ocorria pelo suor. Subseqüentemente, tais pesquisadores documentaram que os níveis de sódio e cloro no suor são elevados em todos os indivíduos com Fibrose Cística.

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

Em 1989, o gene responsável pela FC foi clonado (Rommens, 1989; Riordan, 1989; Kerem et al., 1989). Logo tornou-se claro que seu produto, a proteína CFTR era de fato um canal de cloro defeituoso no epitélio da Fibrose Cística (Bear et al., 1992).

1.2- Características clínicas da Fibrose Cística

A Fibrose Cística é a doença genética autossômica recessiva mais freqüente na população de origem caucasóide. Com a freqüência de portadores de 1 para 25. Sua incidência é de aproximadamente 1:3000 nascimentos vivos na Europa. Nos Estados Unidos a incidência é de 1:3500 e no Brasil, a incidência na região sul assemelha-se a população caucasiana do centro da Europa, porém em outras regiões do país diminui para 1 em cada 10000 nascidos vivos (Davis et al., 1996; Assael et al., 2002; Ribeiro et al., 2002). Os fibrocísticos apresentam um tempo médio de vida de 28 anos (Accurso e Sontag, 2003).

A Fibrose Cística é essencialmente uma doença pós-natal, com poucas manifestações clínicas ao nascimento, como íleo meconial, volvulus, atresia ou amputação intestinal, resultante da secreção intestinal anormal de muco. A gestação de crianças afetadas pela Fibrose Cística é de duração normal, sendo apenas o peso ao nascimento levemente reduzido (Boyer, 1955). Em geral, a doença não se manifesta antes do nascimento e mesmo naqueles casos em que alguma manifestação ocorre, o desenvolvimento do feto é normal.

O fenótipo da Fibrose Cística é complexo e os seus pacientes exibem uma grande variedade de sintomas respiratórios, gastrointestinais e no aparelho reprodutor, bem como níveis elevados de eletrólitos no suor (Tsui, 1995). A maioria dos pacientes apresenta os sintomas no início da vida, apenas uma pequena parte deles manifesta os sintomas tardiamente, na adolescência ou na idade adulta. Portanto, o curso clínico da FC é bastante variável.

As manifestações clínicas resultam em um fenótipo característico de suor salgado (onde a concentração de cloro no suor é maior que 60 milimol por litro (mmol/l) e valores entre 40 e 60 mmol/l são considerados duvidosos, sendo que o teste de suor deve ser repetido), insuficiência pancreática, obstrução intestinal, infertilidade e doença pulmonar grave (Anderson, et al., 1992).

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

A disfunção pancreática, quando presente, pode ter início na fase fetal. A causa dessa disfunção é a obstrução causada por secreções espessas e a subsequente destruição das glândulas exócrinas do pâncreas, que resultam em deficiência pancreática enzimática e desnutrição (Korst et al., 1995). A insuficiência exócrina do pâncreas ocorre em 80 a 90% dos pacientes, apresenta grau variável de acometimento e é progressiva (Reis e Damaceno, 1998).

A mais importante das manifestações intestinais da FC é o íleo meconial, decorrente da obstrução do lúmen ilíaco por massa meconial viscosa. A obstrução intestinal com íleo meconial ocorre em 10 a 20% dos pacientes recém-nascidos (Anderson et al., 1992).

A infertilidade é um sintoma comum nos pacientes, principalmente nos homens (98% dos homens FC são estéreis), ocorre azoospermia devido a obstrução dos vasos deferentes e dos túbulos do epidídimo (Koch e Lanng, 1995).

A fertilidade diminuída das mulheres FC está relacionada ao muco cervical espesso e ocorre em 60% das pacientes (Gilljam et al., 2000).

O pulmão difere dos outros órgãos afetados na Fibrose Cística, sendo que as complicações respiratórias se caracterizam por infecções bacterianas recorrentes e inflamação, as quais são responsáveis por mais de 90% da morbidade e mortalidade em pacientes com Fibrose Cística (Tebbutt et al., 1998). A doença pulmonar característica da FC é obstrutiva crônica estando associada ao espessamento das secreções mucosas. Infecções recorrentes e persistentes no trato respiratório, especialmente as causadas por *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, podem resultar em bronquiectasia e insuficiência respiratória (Korst et al., 1995). Aproximadamente 80% dos pacientes com FC, adquirem a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* que resulta em perda progressiva da função pulmonar levando à morte (Demko et al., 1995).

1.3- O gene da Fibrose Cística e a proteína cftr

O gene responsável por essa anormalidade foi localizado no cromossomo 7, região q.31 (Figura 1) e finalmente clonado por meio da "Genética reversa" (Rommens, 1989). Análises de seqüências de DNA e estudos comparativos de seqüências deduzidas de aminoácidos revelam diversas homologias com proteínas de membrana celular, daí a adoção do termo "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"(CFTR) para o produto gênico (Riordan, 1989). A prova final da identidade e função do gene da Fibrose Cística foi obtida pela capacidade de restaurar o fenótipo normal em células com Fibrose Cística transformadas em cultura (Rich et al., 1990).

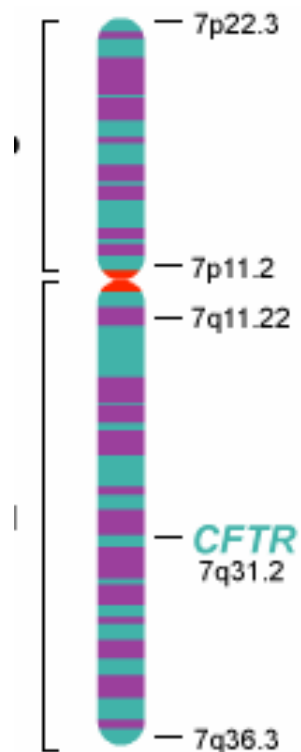


Figura 1- Representação da localização do gene *CFTR* no cromossomo 7, região q.31 (Rommens, 1989)

A proteína cfr possui 1480 aminoácidos, com massa molecular de 168.138 dáltons. Sua estrutura básica é formada por três sub-unidades principais : uma porção hidrofóbica, outra hidrofílica e uma porção polar (figura 2). A região hidrofóbica é formada por seis segmentos capazes de atravessar a camada lipídica dupla da membrana celular; a porção hidrofílica contém duas dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP ("nucleotide-ATP-binding folds"- NBF's) e finalmente, o domínio polar R com sítios potenciais para fosforilação pelas proteínas quinase A e C e N-glicosilase (Riordan, 1989).

A sequência de ativação dos canais de Cl dá-se do seguinte modo: A proteína quinase A (PKA) fosforila sítios no domínio regulatório da proteína, produzindo um canal fechado, cuja abertura requer a ligação de MgATP a um ou aos dois domínios de ligação a nucleotídeos. A ligação do MgATP coloca o canal em um novo estado, podendo agora abrir espontaneamente. A reação inicial de fosforilação é reversível através de fosfatases (Frizzell, 1995). O defeito básico está associado com a diminuição da condução de íons Cl através da membrana apical de células epiteliais e a redução da permeabilidade ao cloro reduz a secreção de fluídos e eletrólitos, resultando em desidratação luminal. Assim sendo, indivíduos afetados por Fibrose Cística possuem um comprometimento do transporte de cloreto. Como consequência, os níveis de íons cloro encontram-se aumentados no suor dos pacientes. Os valores dos íons sódio também estão acrescidos, pois o aumento da negatividade intracelular favorece a entrada de sódio.

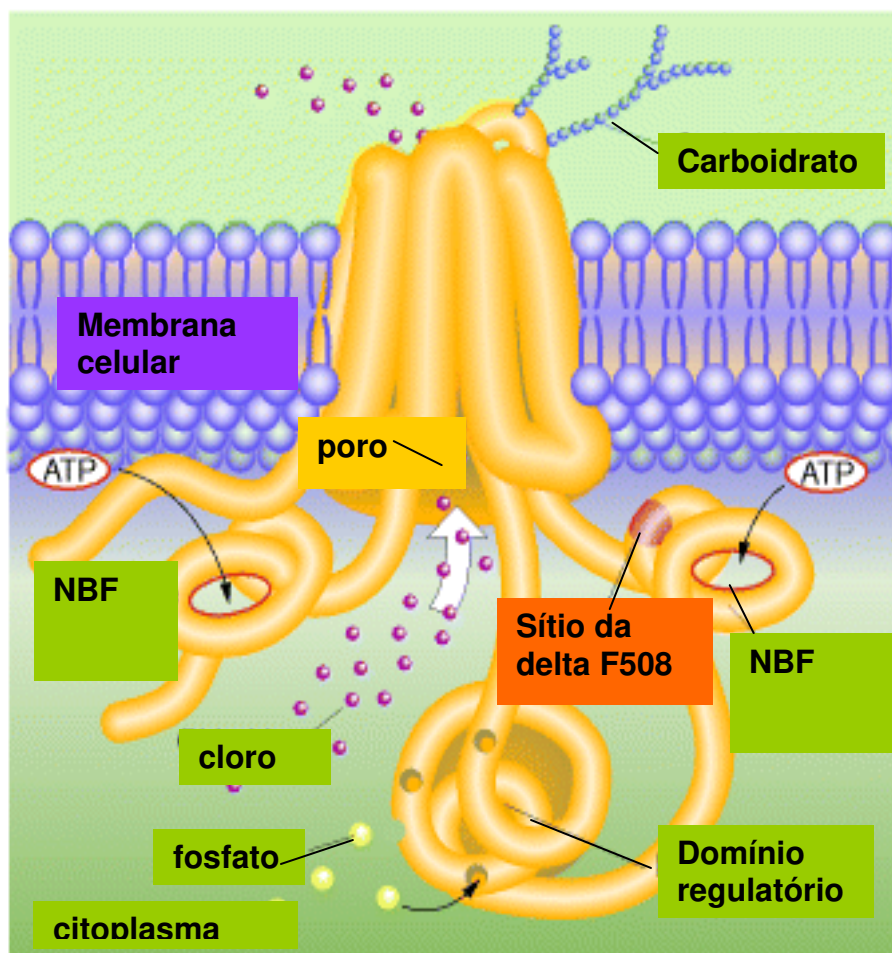


Figura 2- Representação da estrutura da proteína cftr na membrana celular. Formada por três-subunidades: uma porção hidrofóbica (seis segmentos que atravessam a membrana celular); outra hidrofílica (duas dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP); e o domínio polar R (responsável pela abertura do canal) (Southern, 1997).

1.4- Mutações do gene *CFTR*

Existem 1500 mutações relatadas no gene *CFTR* (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). Um total de 27 éxons foram identificados no gene *CFTR* (Zielenski, 1991), três a mais do que originariamente descrito por Riordan (1989). Dos éxons 9 a 12, englobando cerca de 150 aminoácidos, está codificado o primeiro NBF (Dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP). Nessa região, no resíduo 508 da proteína, ocorre a mutação mais freqüente, a $\Delta F508$, no éxon 10 do gene (Figura 3), que é caracterizada como uma deficiência de três pares de bases, a qual determina a perda de uma fenilalanina na proteína *cftr* (Kerem et al., 1989). A mutação $\Delta F508$ ocorre em 70% dos fibrocísticos nos USA (Knowles, 2006).

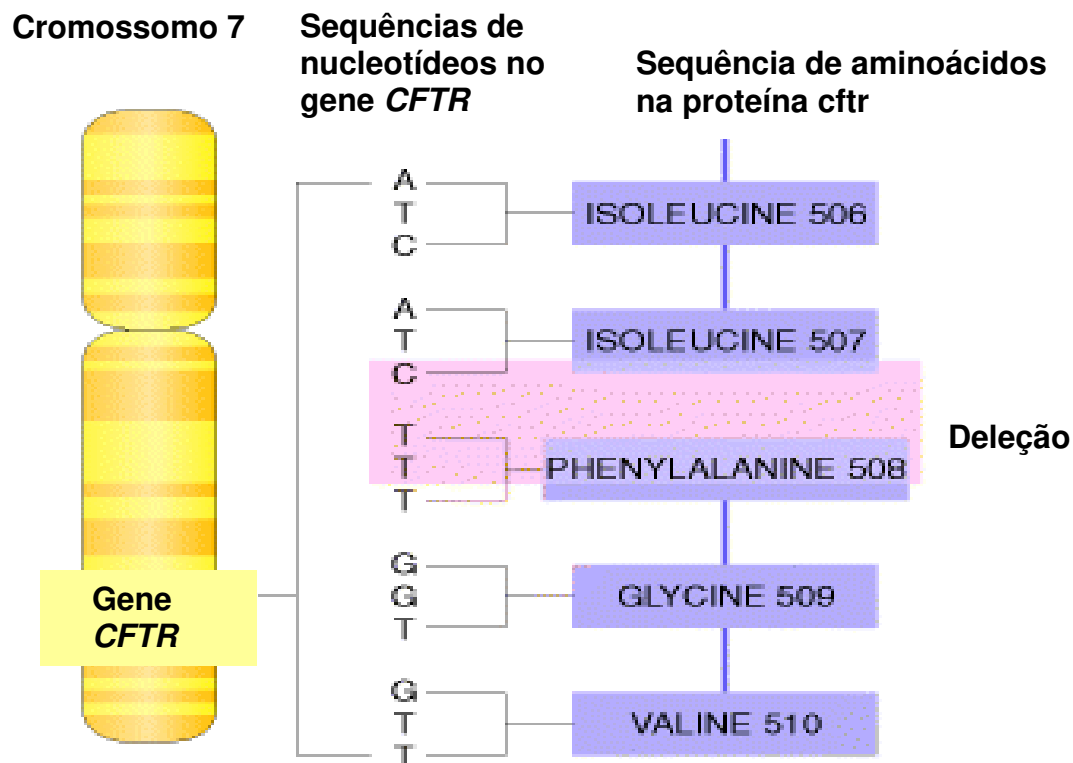


Figura 3- Representação esquemática da deleção de três pares de bases no gene da *CFTR*, correspondendo à mutação $\Delta F508$ (Kerem et al., 1989).

A prevalência da mutação $\Delta F508$ varia de acordo com a população estudada. Assim, foram constatadas prevalências de 80% na Inglaterra; 70% na América do Norte (Chillon et al., 1993); 67% na França (Chomel et al., 1990); 50% na Espanha; 42% na região de Verona, na Itália, e 27% na Turquia (Chillon et al., 1993). Devido à importância dessa anomalia e à frequência elevada dessa mutação, foi realizado um esforço conjunto de pesquisadores visando o mapeamento dessa mutação no Continente Europeu (European Working Group, 1990).

Apesar da frequência elevada da mutação $\Delta F508$, mais 1000 outras alterações gênicas foram descritas, a maioria localizada nos éxons 10 e 11. Nenhuma delas atinge prevalência tão elevada, quanto a mutação $\Delta F508$.

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

No Brasil, foi realizado um estudo inicial com 80 pacientes portadores de Fibrose Cística e foi verificado a presença das 5 mutações : $\Delta F508$, G542X, G551D, R553X e N1303K. Verificamos que as mutações juntas perfazem cerca de 40% dos alelos mucoviscidóticos (26,03% - $\Delta F508$; 6,85% - G542X; 2,74% - N1303K; 2,05% - G551D e 2,33% - R553X) (Parizotto, 1996).

1.5- Correlação genótipo- fenótipo

A correlação genótipo-fenótipo na Fibrose Cística é bastante complexa. Em 1993, foi criado um Consórcio com 89 Centros de pesquisa a fim de tentar elucidar essa relação entre o genótipo e o fenótipo em pacientes portadores da doença.

Mutações no gene *CFTR* são subdivididas dentro de cinco classes (figura 4) de acordo com Welsh et al. (2001):

Classe I - o defeito ocorre na produção da proteína. Não vai ocorrer a síntese protéica. Por exemplo: a mutação “nonsense” G542X, localizada no éxon 11 do gene *CFTR*;

Classe II - o defeito ocorre na maturação e processamento da proteína. Por exemplo: deleção $\Delta F508$ e mutação “missense” N1303K, localizada no éxon 21 do gene *CFTR*;

Classe III - o defeito ocorre na regulação do canal. Por exemplo: mutação “missense” GH551D, localizada no éxon 11 do gene *CFTR*;

Classe IV - ocorre alteração na condução do canal. Por exemplo: a mutação “missense” R117H, localizada no éxon 4 do gene *CFTR*, e a R347P, localizada no éxon 7 do gene *CFTR*;

Classe V - altera a estabilidade da proteína e o processamento da *cftr* é normal, porém em quantidade reduzida. Por exemplo: a mutação de splicing 3849+10kbC $\rightarrow$ T, localizada no íntron 19 do gene *CFTR*.

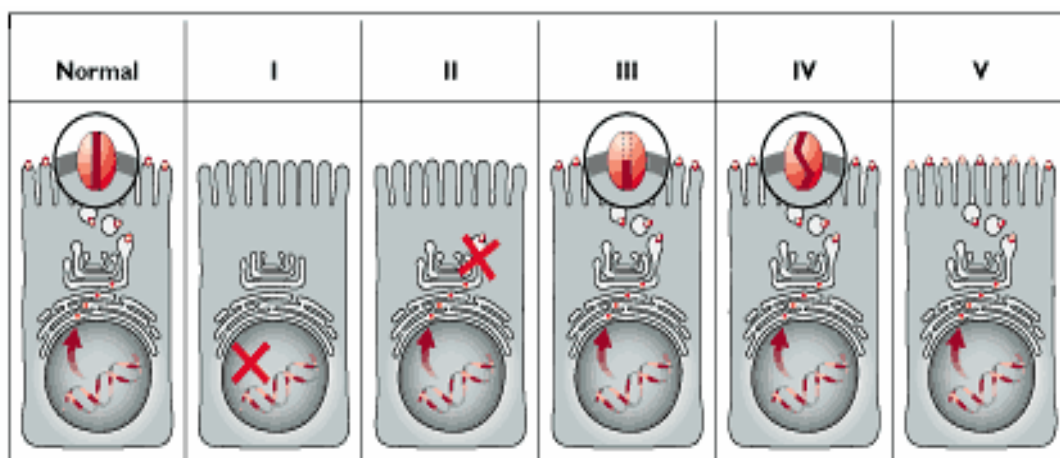


Figura 4- Esquematização celular das 5 classes de mutações na Fibrose Cística.

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

Recentemente, o número de classes foi estendido para seis (Vankeerberghen et al., 2002), tendo sido incorporada à classe VI.

Classe VI - alteração que afeta as propriedades de regulação da proteína *cftr*. Por exemplo: a mutação A455E, localizada no éxon 9 do gene *CFTR*.

Uma correlação clara é observada entre o genótipo *CFTR* e a insuficiência pancreática: mutações nas classes I, II, e III estão associadas com um declínio na expressão ou função do gene *CFTR*, e invariavelmente a uma insuficiência pancreática (Zielenski, 2000). Mutações nas classes IV e V estão associadas à função residual do gene *CFTR*, e são geralmente associadas a uma função pancreática satisfatória (Koch et al., 2001; MCKone et al., 2003).

O curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão relacionados ao genótipo *CFTR*. Esse achado veio de encontro ao estudo realizado em gêmeos mono e dizigóticos, onde encontrou-se uma forte contribuição genética na doença pulmonar, sem contudo ser dependente do genótipo *CFTR* (Santis et al., 1992).

O pulmão difere da maioria dos outros órgãos afetados na FC. As complicações respiratórias se caracterizam por infecções bacterianas recorrentes de inflamação, sendo responsável pela maior causa de morbidade e mortalidade nos fibrocísticos (Accurso e Sontag, 2003).

A doença pulmonar pode ser influenciada por fatores clínicos e ambientais, como a idade do paciente, o estado pancreático, estado nutricional, história de fumo e a colonização por bactérias (Mahadeva e Lomas, 2000). E também pode ser influenciada por fatores genéticos, incluindo variações de DNA em íntron, genes modificadores que estão fora do locus do gene da Fibrose cística ou uma segunda mutação no mesmo alelo que atenua o efeito da mutação principal (Kerem e Kerem, 1996; Dork et al., 1991; Bienvenu, 1997). A produção excessiva de muco, a obstrução das vias aéreas, citocinas em que há o aumento nos níveis da interleucina 8 (IL-8) e a redução nos níveis da interleucina 10 (IL-10) no pulmão dos fibrocísticos (TOBIN, 2003), e o domínio de neutrófilos na resposta celular, produzem uma quantidade excessiva de elastase ocasionando uma bronquiectasia grave (Drumm, 2001).

1.6- Genes modificadores na Fibrose Cística

Genes modificadores fora do locus da Fibrose Cística podem influenciar na gravidade do fenótipo dos fibrocísticos através de vários mecanismos. Eles podem modular o fenótipo agindo na base do nível molecular, tal como, alternando a condução de cloro e regulando o “splicing” e a expressão do gene *CFTR*. Eles podem também modular a susceptibilidade à infecção e a resposta inflamatória. Além disso, o quadro pulmonar dos fibrocísticos pode ser modificado por genes associados com clearance mucociliar e os danos e reparo do tecido epitelial (Slieker et al., 2005).

O conceito de múltiplos modificadores genéticos na doença Mendeliana, como na Fibrose Cística, é diferente do conceito de múltiplos variantes genéticos na doença não Mendeliana, como na asma (Figura 5). Nas doenças genéticas complexas, variantes genéticas múltiplas interagem umas à outra (e o ambiente) causando a doença. Ao contrário, a Fibrose Cística é causada por mutações no gene *CFTR*, e variações genéticas que relatam a cascata de patogenia da mutação no gene *CFTR*, modificam a gravidade do fenótipo. De fato, polimorfismos genéticos que apresentam um pequeno efeito ou não em sujeitos normais, podem ser modificadores da doença na Fibrose Cística (Knowles, 2006).

A identificação desses genes modificadores ajudarão não somente no entendimento da patofisiologia, como também no uso de tratamentos convencionais e proporcionará alvos para uma intervenção terapêutica futura (Boyle, 2003; Boyle, 2007).

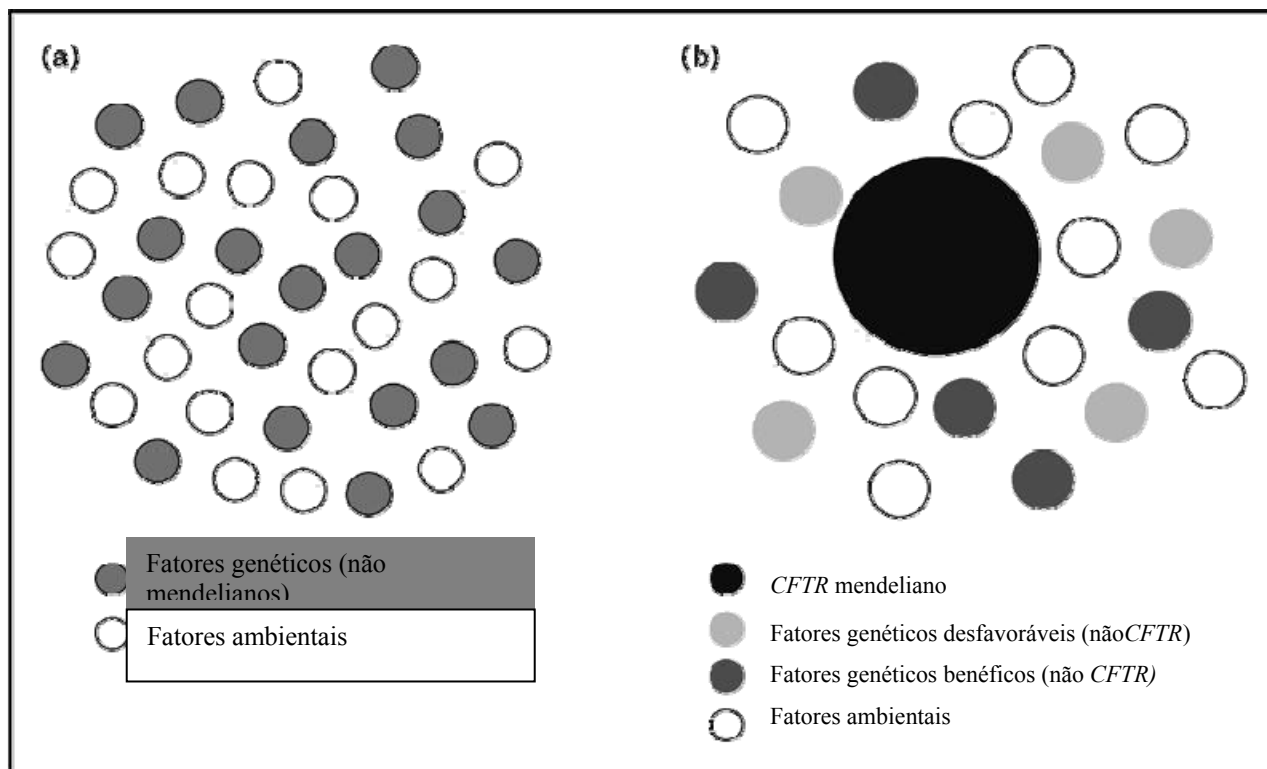


Figura 5- Variantes genéticos múltiplos na doença mendeliana e na doença não mendeliana. a)Variantes genéticos múltiplos e influências ambientais interagem para causar a doença, como na asma. b) Na mutação do gene *CFTR* da Fibrose cística, existem variantes genéticos não ligados ao gene *CFTR* (ambos desfavoráveis ou benéficos) que modificam a gravidade na Fibrose Cística, em conjunto com fatores ambientais (Knowles, 2006).

Alguns desses genes modificadores são discutidos abaixo.

1.7- MBL (Lectina ligadora da manose)

Também designada como lectina ligadora da manose, a MBL é uma proteína plasmática, com papel importante no sistema de defesa inato, que constitui o primeiro componente de ativação da via das lectinas do sistema complemento e atua na neutralização

de microorganismos patogênicos por um mecanismo independente de anticorpo (Turner, 1996; Wallis e Dodd, 2000; Guardia e Lozano, 2003). A MBL é encontrada no soro de mamíferos e é considerada uma proteína de fase aguda (Ezekowitz et al., 1988; Thiel et al., 1992).

A MBL é uma molécula reconhecida do sistema complemento (Turner e Hamvas, 2000; Petersen et al., 2001). O sistema complemento é importante na defesa do hospedeiro e pode ser ativado através de três caminhos principais : o caminho clássico, o caminho alternativo e o caminho da MBL (Walport, 2001; Walport, 2001). A via clássica é desencadeada por ligação antígeno-anticorpo; a via alternativa, que pode ser iniciada pela ligação de C3 (convertase de C3, é uma enzima chave) ativado espontaneamente no plasma à superfície de microorganismos e a via das lectinas, ativada através da ligação da MBL a estruturas polissacarídicas na superfície de microorganismos.

A MBL ativa o sistema complemento pela MBL – associada à serina protease e pode interagir com receptores na fagocitose ligando-se à manose ou à N - acetilglicosamina na superfície da bactéria (Matatsushita e Fujita, 1992). A MBL opsoniza diretamente o microorganismo para a fagocitose e modula a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Jack e Turner, 2003).

O padrão de reconhecimento da MBL é definido através da conformação espacial e do sentido de orientação de seu domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), determinando o tipo de ligante da proteína, microorganismos com quantidade elevada de manose (ou N-acetil-D-glucosamina ou similar) e glicanos em sua superfície (Jack e Turner, 2003).

Quando ocorre a ligação ao microorganismo, a MBL pode desencadear várias atividades anti-microbianas. A proteína interage com, pelo menos, quatro proteínas relacionadas ao Sistema serina protease associado (MASP): MASPs 1, 2, 3 e uma forma “truncada” de MASP 2, a Map 19. Essa interação, por sua vez, ativa a cascata do complemento com a lise direta dos microorganismos ou com o aumento da fagocitose (Turner, 1996; Wallis e Dodd, 2000; Jack e Turner, 2003).

1.7.1- A estrutura da MBL

A MBL pertence a uma família de proteínas chamadas de colectinas. Por microscopia eletrônica, a MBL apresenta aparência de “buquê de tulipas” (Petersen et al., 2001).

Esta proteína é caracterizada pela presença de três subunidades de cadeias polipeptídicas, de 32 kD, covalentemente ligadas por pontes de dissulfeto (domínio NH₂ terminal, rico em cisteína), uma sequência de segmento semelhante ao colágeno e um domínio carbóxi-terminal (CRD, ligante de cálcio – domínio lectina) em cada subunidade. Esta última porção confere à molécula a capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos com especificidade primária para manose, fucose ou N-acetilglucosamina (Holmskov et al., 1994; Summerfield et al., 1995; Prodinger et al., 1998; Ghiran et al., 2000; Kilpatrick et al., 2003; Jack e Turner, 2003), não se ligando significativamente à D-galactose (Jack et al., 2001). Este complexo forma unidades de dímeros a hexâmeros, mas a sua atividade funcional completa requer a presença das estruturas maiores (Turner, 1996; Saiffudin et al., 2000).

1.7.2- Manose associada a serina de proteases

O conceito de via das lectinas na ativação do sistema complemento é relativamente recente e é decorrente da observação de que resíduos de carboidratos em microorganismos invasores podiam ativar o complemento na ausência de anticorpo e por um mecanismo independente da via alternativa. A via das lectinas é composta pela MBL e pelas MASP-1, -2, -3 e a Map-19, porém, apenas MASP-1e -2 apresentam funções definidas.

As cadeias peptídicas são compostas por uma parte do tipo colágeno e por uma parte de lectina. A parte da lectina liga-se através dos “domínios de reconhecimento de carboidratos” (CRDs- “carbohydrate recognition domains”) a diferentes grupos de açúcares como a manose, a maltose, a N-acetilglicosamina, a fucose e a glucose. Esta ligação possui afinidade diminuída e é essencial que mais do que uma parte de lectina de

uma molécula MBL se ligue simultaneamente para se obter uma ligação funcional. Em circulação, a MBL forma um complexo funcional com MASPs 1,2 e 3, que se torna enzimaticamente ativa, após sua ligação a um microorganismo. O complexo MBL-MASP-2 é suficiente para ativar o complemento sem a necessidade de outra serino protease, demonstrando assim, que a MASP-2 é o componente efetor da via das lectinas. O complexo MBL-MASP-1 é responsável pela ativação direta de C3, funcionando como C3 convertase e determinando uma “via alternativa” à via das lectinas, embora alguns autores considerem este assunto controverso (Hajela et al., 2002; Schwaeble et al., 2002). MASP-1 cliva C2 e parece ser capaz de clivar C3 diretamente, enquanto que MASP-2 cliva C4 e C2, o que dá origem à formação de C4b2a. A C4b2a atua com convertase C3 e provoca a clivagem da C3 e a conseqüente formação de C3b, o que por sua vez causa a opsonização da bactéria (Thiel et al., 1992; Reid, 1998; Wallis, 2002; Janeway et al., 2005) (Figura 6).

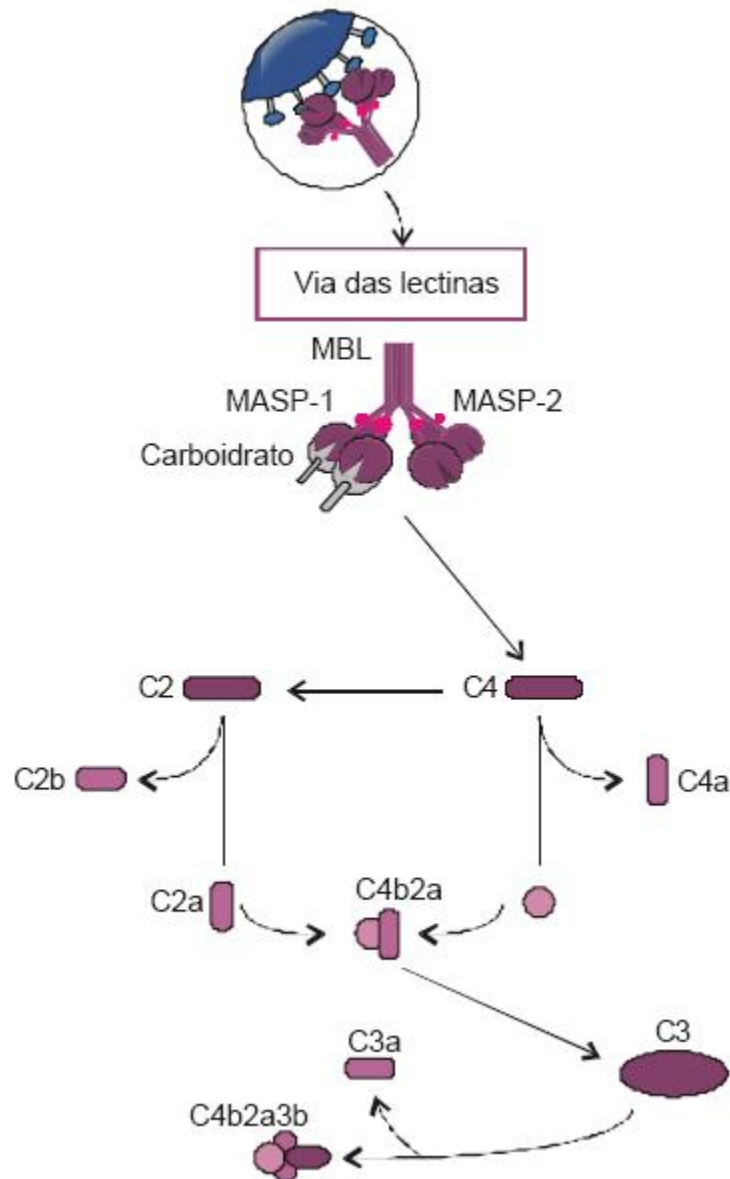


Figura 6- Representação esquemática da via das lectinas de ativação do complemento (Walport, 2001).

1.7.3- A biologia molecular da MBL

São descritos dois genes correlacionados à MBL, o *Mbl-1*, um pseudo gene e o *Mbl-2*, localizados no cromossomo 10, nos braços q22.2-q22.3. e q11.2-q21 respectivamente. O gene é composto por quatro éxons : a) o éxon 1 codifica a região 5'

não –transcrita, um peptídio sinal, um seguimento N- terminal rico em cisteína e a primeira porção da região semelhante ao colágeno rica em glicina; b) o éxon 2 codifica o restante da região semelhante ao colágeno; c) o éxon 3 codifica uma estrutura em espiral α helicoidal, que é conhecida como a região de “pescoço” e d) o éxon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato, que adota uma configuração globular, e a região 3’ não transcrita (Guardia e Lozano, 2003) (Figura 7). Três mutações missense no éxon 1 têm sido encontradas (códon 52, 54 e 57), originando três alelos variáveis denominados D, B e C respectivamente, resultando numa diminuição significativa nos níveis séricos da proteína (Lipscombe et al., 1992, 1996; Madsen et al., 1994). Os polimorfismos do gene *MBL2* são responsáveis por uma imunodeficiência genética comum e difundida na espécie humana. Deficiências de MBL são causadas principalmente por esses três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no primeiro éxon do gene *MBL2* (Teraí et al., 2003; Larsen et al., 2004). O alelo selvagem tem sido denominado A, e os alelos variáveis B, C e D, sendo denominado O (Garred et al., 1999). As três mutações de ponto ocorrem nos nucleotídeos 223 (C - T), 230 (G - A) e 239 (G - A) no éxon 1 nos alelos D, B e C, respectivamente. Isso causa a substituição da arginina pela cisteína no códon 52, a substituição da glicina pelo ácido aspártico no códon 54 e a substituição da glicina pelo ácido glutâmico no códon 57. Essas substituições de aminoácidos podem afetar a estrutura terciária da região de colágeno da proteína (Garred et al., 1992).

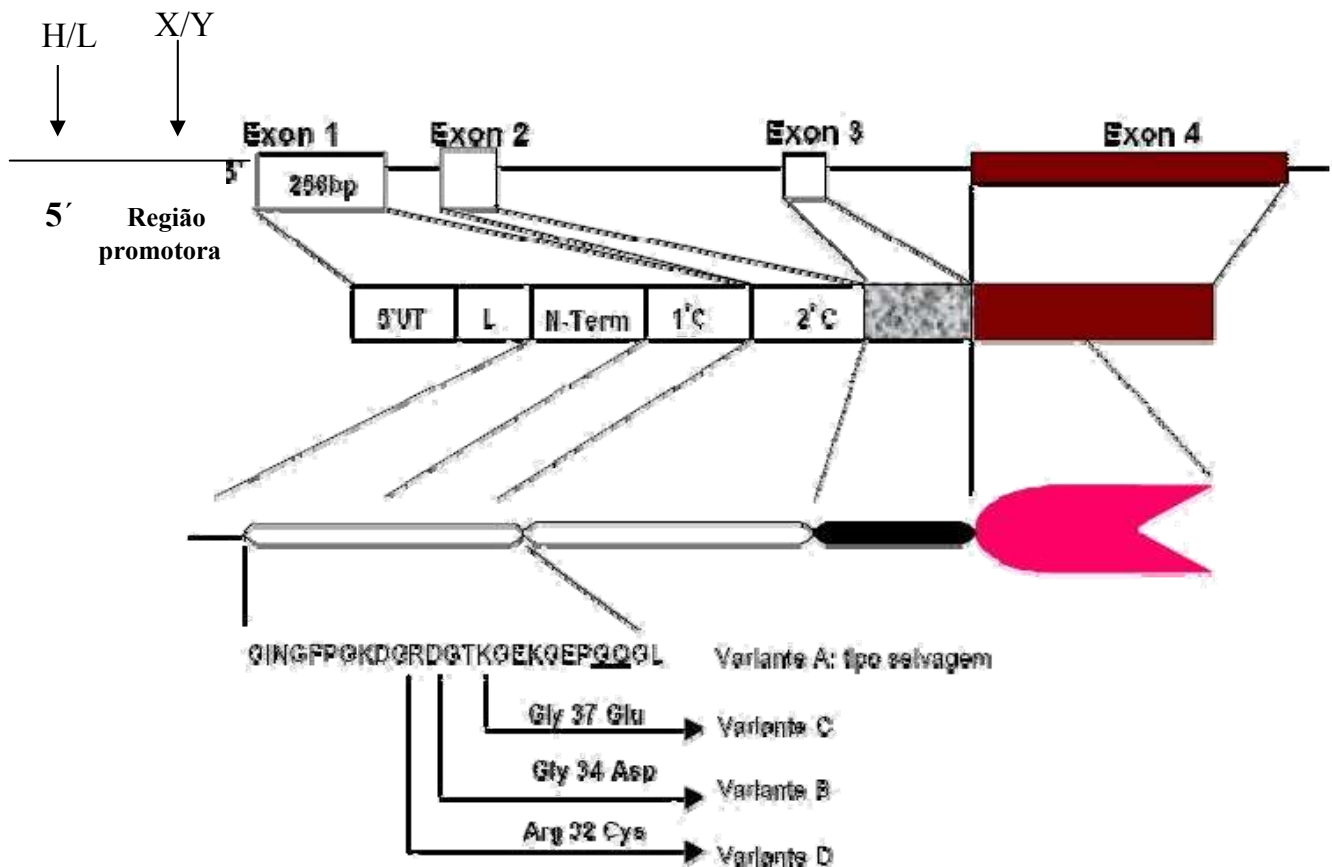


Figura 7- Representações esquemática do gene *MBL2* e das mutações do éxon 1, formando os alelos variáveis B, C e D e na região promotora do gene, os alelos H/L e X/Y (Guardia et al., 2003).

Estudos sugerem que todas as três variantes impedem a habilidade da MBL em formar cadeias polipeptídicas com estrutura de tripla-hélice semelhante ao colágeno nas formas homo ou heterozigotas, ou ainda, tornam as subunidades mais vulneráveis à degradação (Garred et al., 1997; Reid, 1998; Petersen et al., 2001; Butter et al., 2002). Consequentemente, os alelos B, C e D resultam em deficiência completa ou em níveis séricos diminuídos da proteína.

A expressão gênica da MBL é diferente nas diversas populações mundialmente estudadas. A variante B é mais freqüente entre caucasianos europeus (29%) e em populações japonesas (37%); a variante C é característica das populações africanas do sub-Sahara, com freqüência de 50 a 60% e a mutação D alcança freqüências diminuídas em todas as populações (Sumiya et al., 1991; Lipscombe et al., 1992; Sasaki et al., 2000).

Em um estudo na Austrália realizado com 236 voluntários, a freqüência do genótipo selvagem (A/A) foi 57,6%; do heterozigoto para a mutação (A/O) 34,8% (A/D 11%, A/B 19,9%, A/C 3,8%), e o homozigoto (O/O) 7,6% (B/B 2,1%, B/C 2,1%, B/D 2,5%, D/D 0,9%) (Minchinton et al., 2002). Essas freqüências são coerentes com outras populações caucasóides. Em seus estudos, Madsen et al. (1995) e Mead et al. (1997) constataram que homozigotos e heterozigotos compostos para a mutação (O/O) estão associados com nível funcional diminuído da proteína.

Níveis de MBL no soro variam substancialmente dentro de cada genótipo. Polimorfismos adicionais nas regiões promotora (alelos H/L e X/Y) e 5' não traduzida do gene *MBL2* (P/Q, C→T na posição +4, localizado 4bp depois do início do sítio de transcrição), explicam parcialmente essa variação (Worthley et al., 2005). De acordo com Madsen et al. (1995) e Garred et al. (2003), a substituição de um nucleotídeo está presente na região promotora na posição -550, ou seja, localizado 550 bp antes do sítio de início da transcrição (G→C, alelos 'H' e 'L'); e na posição -221, localizado 221bp antes do sítio de início de transcrição (G→C, alelos 'X' e 'Y') (Figura 7). As duas variações H e L, estão em desequilíbrio de ligação com X e Y. Os polimorfismos -550 e -221 na região promotora formam os haplótipos HY, LY e LX (o haplótipo LX é extremamente raro).

O haplótipo HY está associado com níveis plasmáticos elevados de MBL, o haplótipo LY com níveis intermediários e o haplótipo LX está associado com níveis plasmáticos diminuídos de MBL. Haplótipos de indivíduos contendo a variante X resultam em níveis de MBL similares às variantes B, C e D (Madsen et al., 1995; Steffensen et al., 2000; Guardia e Lozano, 2003). O desequilíbrio de ligação entre os SNPs na região promotora e éxon 1 do gene *MBL2*, é responsável pela ocorrência de sete haplótipos: LYPB, LYQC e HYPD, resultam na ausência de MBL; LXPA em níveis diminuídos de MBL; LYPA em níveis intermediários de MBL e HYPA e LYQA em níveis elevados de MBL (Garred et al., 2006).

Em um estudo realizado por Boldt et al. (2006), foram analisadas seis populações brasileiras do sul do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1- Frequências dos haplótipos de MBL2 em seis populações brasileiras, comparadas com outras populações (Boldt et al., 2006).

População	N	He	<i>HYPA</i>	<i>LYQA</i>	<i>LYPA</i>	<i>LXPA</i>	<i>LYPB</i>	<i>LYQC</i>	<i>HYPD</i>	<i>LYPD</i>
Afro-Brazilian	32	0.81	0.13	0.25	0.27	0.11	0.03	0.20	0.02	0
Kenyan]	61	0.81	0.08	0.25	0.13	0.24	0.02	0.24	0.04	nd
Mozambican	154	0.76	0.06	0.27	0.30	0.13	0	0.24	0	0
Euro-Brazilian	202	0.78	0.34	0.18	0.08	0.22	0.11	0.003	0.06	0.003
Dutch	212	0.80	0.27	0.22	0.05	0.21	0.15	0.04	0.05	nd
Czech	359	nm	0.33	—0.27—		0.22	0.12	0.01	0.04	0.01
Australian	236	nm	0.26	—0.27—		0.22	0.14	0.03	0.08	nd
Danish	350	0.79	0.30	0.20	0.04	0.24	0.12	0.03	0.07	nd
Oriental-Brazilian	16	nm	0.50	0.125	0	0.19	0.19	0	0	0
North Chinese	174	0.64	0.55	0.14	0.03	0.14	0.14	0	0	0
South Korean	129	0.65	0.54	0.11	0.06	0.11	0.18	0	0	0
Japanese	325	0.72	0.44	0.16	0.06	0.12	0.22	0	0 ^a	0
Central Desert	103	0.39	0.76	0.03	0.18	0.02	0.01	0	0.005	nd
Warlpiri	190	0.39	0.75	0.01	0.22	0.01	0	0	0.003	nd
Eskimo	72	0.33	0.81	0	0.04	0.03	0.12	0	0	0
North Amerindian	217	nm	0.64	—0.18—		0.15		0.005	0.022	nd
Kaingang	239	0.59	0.56	0.004	0.14	0.006	0.29	0.004	0	0
Guarani	152	0.56	0.50	0.05	0.007	0.003	0.44	0	0	0
Chiriguano	43	0.54	0.54	0.01	0.02	0.01	0.42	0	0	0
Mapuche	25	0.66	0.38	0	0.08	0.04	0.46	0.04	0	0
Admixed Brazilian	107	0.82	0.20	0.29	0.08	0.17	0.16	0.07	0.04	0
Gran Canarian	344	0.82	0.24	0.22	0.08	0.19	0.17	0.03	0.07	nd

He- heterozigotidade esperada

nd- não determinado

nm- não significativo

As formas alélicas distintas são efetivamente diferentes na ativação do sistema complemento. Acredita-se que essas diferenças qualitativas e quantitativas, influenciem na predisposição à infecção e impeçam a proteína de ativar o sistema complemento (Summerfield et al., 1995; Prodinger et al., 1998).

1.7.4- Produção no sítio da MBL

A MBL foi isolada e clonada primeiramente de hepatócitos, e o fígado é considerado o principal sítio de síntese da MBL (Summerfield e Taylor, 1986). Contudo, alguns estudos clínicos e experimentais sugerem que a MBL pode ser sintetizada em quantidades significantes em tecidos não hepáticos. Monócitos humanos e monócitos derivados de células dendríticas são capazes de sintetizar a MBL “in vitro” (Downing et al., 2003). Alguns estudos em camundongos têm também demonstrado a expressão extra-hepática da MBL, com os sítios responsáveis incluindo o intestino delgado, rim, bem como em células linfóides e mielóides (Morio et al., 1997; Uemura et al., 2002; Wagner et al., 2003). A importância clínica relativa da síntese da MBL hepática e não hepática continua não clara, e mais pesquisas nessa área são necessárias.

1.7.5- Deficiência da MBL e suas repercussões clínicas

A deficiência da MBL foi reconhecida, inicialmente em 1968, por Miller e col., que descreveram uma criança de 3 meses de idade, do gênero feminino, com quadro de eczema refratário, falência de crescimento e episódios intermitentes de diarreia. A criança apresentava história familiar de eczema atópico grave. Após avaliação laboratorial, demonstrou-se deficiência na capacidade fagocítica, sem alteração nos demais exames imunológicos avaliados. Este caso clínico representou, provavelmente, o primeiro relato de deficiência de MBL.

As conseqüências clínicas da deficiência de MBL têm sido estudadas extensivamente nos últimos 17 anos, mas a função biológica desta lectina na defesa do hospedeiro em humanos continua sendo uma questão em debate (Casanova e Abel, 2004;

Klein, 2005). Existem controvérsias sobre a imunologia da doença que resultam em informações aparentemente contraditórias, geradas por vários estudos clínicos, genéticos e epidemiológicos. Em alguns estudos, a MBL parece desempenhar a função de proteção na defesa do hospedeiro, como, na ausência de MBL ou níveis diminuídos de MBL foram associados à susceptibilidade elevada a várias doenças infecciosas (Eisen e Minchinton, 2003). Contudo, algumas dessas associações foram preliminares, causando dúvidas na significância clínica da deficiência de MBL (Casanova e Abel, 2004; Klein, 2005). Mais controvérsias têm resultado de uma população baseada em estudos longitudinais, mostrando que a deficiência de MBL em adultos não está associada com um risco elevado de morbidade e mortalidade causada por infecções (Dahl et al., 2004). Além do mais, a deficiência de MBL em crianças lidera somente um pequeno aumento no risco de doença respiratória (Koch et al., 2001). Portanto, as manifestações clínicas da deficiência de MBL, parecem ser de grande importância durante a infância, onde a imunidade adaptativa não tem sido desenvolvida ainda, e sua defesa depende de anticorpos maternos e da imunidade inata (Mussi-Pinhata e Rego, 2005).

Há alguns autores que relatam um papel protetor dos níveis séricos diminuídos de MBL e a infecção por microorganismos intracelulares, o que poderia ser explicado pela diminuição da ativação do sistema complemento com conseqüente diminuição do processo inflamatório (Sobrog et al., 2003; El Sahly et al., 2004). Portanto, a deficiência de MBL foi encontrada estar associada com a proteção contra a gravidade da leprose segundo Garred et al. (1994), tuberculose segundo Eisen e Minchinton (2003); Sobrog et al. (2003), leishmaniose visceral segundo Santos et al. (2001), e cardiopatia reumática segundo Schafranski et al. (2004) entre outras condições.

1.8- TGF- β (Fator de crescimento e transformação - β)

Muitos eventos biológicos são regulados por interações celulares, que podem ser caracterizados em dois tipos: entre membranas celulares e mediadas por sinalizadores celulares, tal como citocinas. Citocinas são proteínas solúveis de pequena massa molecular produzidas por diferentes tipos celulares que apresentam a função de alterar o

comportamento ou as propriedades celulares no local ou sistematicamente (Alberts, 1994). Incluem proteínas dos grupos das citocinas: as interleucinas, os interferons, os fatores de crescimento, os fatores citotóxicos, os fatores inibidores ou ativadores e os fatores estimulantes de colônias. As citocinas apresentam funções importantes em inúmeros processos biológicos como proliferação, diferenciação, regeneração, inflamação e na resposta imunológica celular e humoral.

O TGF- β é membro de uma família de fatores de crescimento e diferenciação, com múltiplas funções em uma variedade de diferentes sistemas de órgãos. O TGF- β é notável por sua capacidade de modular uma variedade de comportamento celular, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose *in vivo* e *in vitro* (Sporn e Roberts, 1992; Grande, 1997; Massagué et al., 1997). A desregulação na ativação de TGF- β e sinalização podem resultar em apoptose.

Muitas células sintetizam TGF- β , incluindo plaquetas, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, células ósseas e queratinócitos e quase todas elas apresentam receptores específicos para o seu peptídeo.

Existem três isoformas de TGF- β (TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3), as quais são relacionadas estruturalmente com 60 a 80% de sequência homóloga (Grande, 1997). Cada isoforma é codificada por genes distintos e é expressa em um tecido específico.

Os genes *TGF β 1*, *TGF β 2* e *TGF β 3* foram mapeados nos cromossomos 19q13.1-q13.3, 1q41 e 14q23-24, respectivamente (Fujii et al., 1986; Barton et al., 1988). O gene *TGF β 1* é expresso em células endoteliais, hematopoéticas e células de tecidos relacionados. O *TGF β 2* é expresso em células epiteliais e neuronais e o *TGF β 3* é expresso em células mesenquimais (Blobe et al., 2000). Essas moléculas são secretadas na forma latente como homodímeros, e devem ser ativados para desempenhar suas funções biológicas.

Os TGF- β s apresentam massa molecular de 25 KDa. Contudo, os TGF- β s são sintetizados e secretados como um complexo latente (Shute et al., 2003).

A produção de TGF β 1 varia de pessoa para pessoa e depende parcialmente de polimorfismos no gene *TGF β 1* em diferentes posições (Awad et al., 1998; Grainger et al., 1999). A desregulação patológica de TGF β 1 modula o desenvolvimento de um grupo de doenças graves, incluindo câncer, arteriosclerose, doenças autoimune e também doenças de fibrose (Shirai et al., 1992; Awad et al., 1998; Grainger et al., 1999).

1.8.1- Polimorfismo genético para *TGF β 1*

O gene *TGF β 1* apresenta sete éxons e seis íntrons. Estudos têm identificado um número de polimorfismos no gene *TGF β 1* (Cambien et al., 1996; Awad et al., 1998; Syrris et al., 1998; Lympany et al., 1998). Um desses polimorfismos, está localizado na posição +869 (T-C), no códon 10 do éxon 1 do gene *TGF β 1* (figura 8), onde ocasiona a mudança do aminoácido leucina pela prolina (Grainger et al., 1999). Segundo Wu et al. (2004), o genótipo CC está associado a concentrações elevadas de TGF β 1 no soro, com relação ao genótipo TC, o qual, por sua vez está associado a concentrações mais elevadas que o genótipo TT, sugerindo que o genótipo que apresenta uma maior concentração de TGF β 1, pode proteger contra o desenvolvimento de doença pulmonar obstrutiva crônica.

Suthanthiran et al. (2000) relataram que o alelo C foi mais freqüente em indivíduos negros quando comparados aos brancos, e está associado a níveis elevados na concentração de TGF β 1.

Segundo Wu et al. (2004), em um estudo realizado em indivíduos controles na Nova Zelândia, a freqüência dos polimorfismos +869 (T-C) foram 29,3%, 52,1% e 18,6% para os genótipos TT, TC e CC, respectivamente.

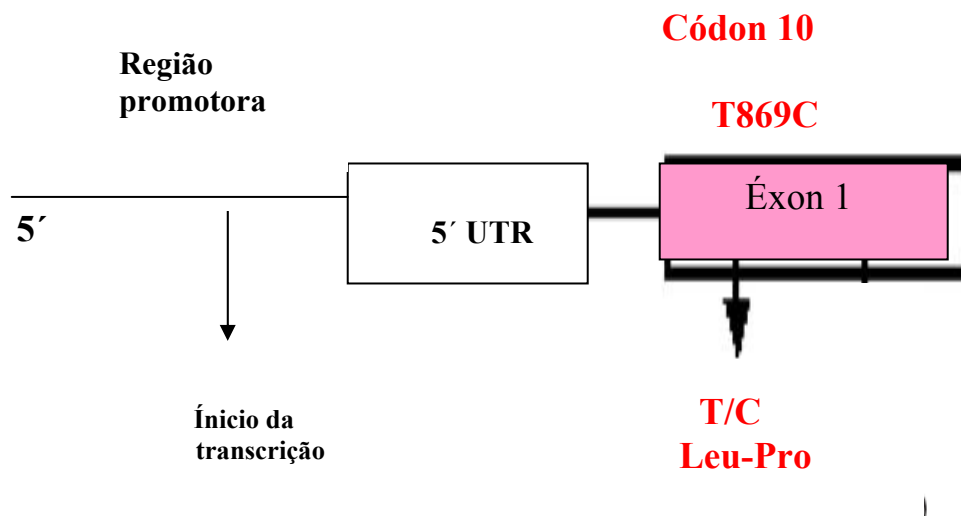


Figura 8- Polimorfismo +869 (T-C), localizado no códon 10 do éxon 1 do gene *TGF-β1* (Grainger et al., 1999).

1.8.2- Expressão de TGFβ no pulmão

Em humanos, células do epitélio bronquial contém uma grande quantidade da proteína TGFβ. As isoformas de TGFβ e seus receptores têm sido encontradas em macrófagos alveolares, células mesenquimais, células do músculo liso das vias aéreas, e glândulas bronquiais (Magnan et al., 1994; Coker et al., 1996; Khalil et al., 1996; Jagirdar et al., 1997; De Boer et al., 1998). Células do epitélio alveolar contém TGFβ2 e TGFβ3 (Khalil et al., 1996). Alguns estudos detectaram TGFβ no epitélio normal (Coker et al., 1996; De Boer et al., 1998; Jagirdar et al., 1997). Outros estudos relataram a presença epitelial de TGFβ1 somente em associação com fibrose (Khalil et al., 1996).

A presença de TGFβ em um pulmão normal sugere a participação na regulação normal do processo fisiológico para manter a homeostase do pulmão. Essas funções incluem a imunomodulação local, regulação da proliferação e diferenciação celular, tão bem como o controle do reparo normal do tecido.

1.8.3- A função de TGF β na patogenia da doença pulmonar

Uma característica comum de muitas formas de doença no pulmão é o processo inflamatório com fase de dano no tecido, seguida por fase de reparo (Magnan et al., 1994; Elssner et al., 2000). O tecido pulmonar danificado por efeitos químicos, bacteriológicos ou imunológicos lidera a indução de TGF β que limita algumas das reações inflamatórias e desempenha a função chave mediante o remodelamento e reparo do tecido (Kehrl et al., 1986; Rook et al., 1986; Sporn e Roberts, 1992; Ahuja et al., 1993). Se o processo reparativo é exagerado e não é localizado adequadamente, a patologia no pulmão com fibrose seguirá. Isto é tipicamente associado ao aumento nos níveis de TGF β e seus receptores, e a superexpressão de TGF β tem sido demonstrado resultar em fibrose pulmonar grave (Sime et al., 1998).

1.8.4- O tecido brônquico danificado na FC

Em seus estudos estruturais, Durieu et al. (1998) demonstraram a perda de colágeno e elastina no tecido brônquico. De acordo com Stone et al. (1995), estudos bioquímicos demonstraram a aparência rompida de colágeno e elastina na urina de pacientes fibrocísticos. A degradação da matriz do tecido brônquico é consequência da infecção e do processo inflamatório e, particularmente do desequilíbrio de protease/antiprotease na Fibrose Cística (Birrer et al., 1994). Elastase de neutrófilos e elastase de *Pseudomonas aeruginosa*, clivam elastina, colágeno e proteoglicanos (grupo de proteínas que compõem o que é conhecido como a “substância base” da cartilagem, dando resistência e elasticidade à articulação) e contribuem potencialmente para o dano do tecido na FC (Suter et al., 1984; Davis et al., 1996; Kon et al., 1999). A elastase de neutrófilos ativada, estimula a hipersecreção de muco, a síntese do quimioatraente de neutrófilos, a IL-8, pelas células epiteliais das vias aéreas e proteoliticamente inativa o inibidor de elastase, alfa 1 antitripsina, perpetuando o aumento de função na patofisiologia da FC (Nakamura et al., 1992; Kohri et al., 2002). O aumento na inflamação predispõe à fibrose, e consequentemente o processo de reparo, que é estimulado pelos fatores de crescimento.

1.8.5- Fatores de crescimento na Fibrose Cística

É reconhecido que a função de fatores de crescimento são regulados por outros mecanismos que o nível de expressão de qualquer fator de crescimento ou seu receptor. Como em outros tecidos, a atividade do fator de crescimento nas vias aéreas é regulado pelo sequestro e ligação de moléculas na matriz extracelular (Taipale e Keski-Oja, 1997). A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como a organização supramolecular de diversas proteínas estruturais e polissacarídeos nos tecidos conjuntivos que preenchem os espaços extracelulares.

Embora as proteases, estejam associadas ao dano no tecido, elas também podem contribuir para o reparo de tecido, via liberação e ativação dos fatores de crescimento na matriz extracelular (Figura 9).

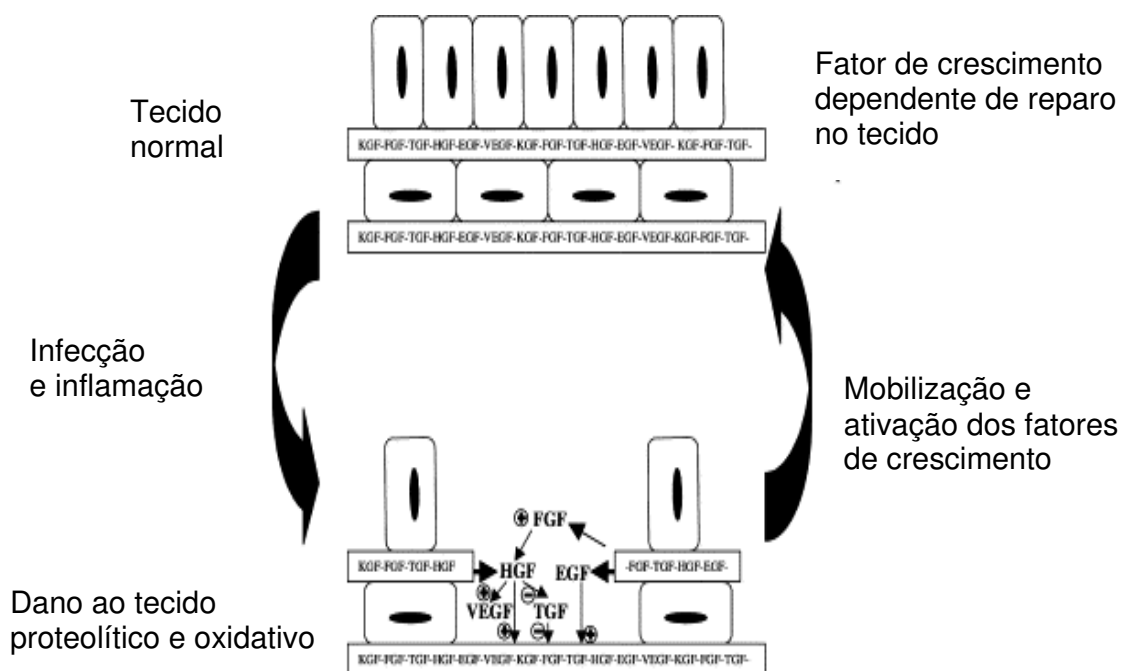


Figura 9- Fatores de crescimento na matriz extracelular. Os “tijolos” e o “almofariz” do tecido normal. Segue o tecido danificado, onde fatores de crescimento são liberados de sítios ligados na matriz extracelular e mediando o reparo de tecido (Shute et al., 2003).

1.9- CD14

O *CD14* é um gene chave do sistema imune inato. Funciona como receptor para lipopolissacarídeos (LPS), componente da membrana externa de bactérias gram negativas (um elemento constitutivo da parede celular da *Pseudomonas aeruginosa*), que possui grande poder imunogênico. É um modificador importante da gravidade do quadro pulmonar em pacientes fibrocísticos (Martin et al., 2005). Os efeitos biológicos do LPS no organismo ocorrem a partir da ligação deste ao CD14.

O CD14 tem duas formas de apresentação a 50-55 kDa, ligado à membrana (mCD14) ou solúvel no plasma (sCD14). O mCD14 participa claramente na indução da resposta inflamatória e o sCD14 também está relacionado à ativação de células inflamatórias, sendo que níveis aumentados estão associados à mortalidade elevada por choque séptico por bactérias gram negativas (Landmann et al., 1995). O mCD14 é expresso primeiramente na superfície de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Haziot et al., 1988). O sCD14 parece derivar de monócitos, tão bem como no fígado, e é encontrado em concentração normal no soro (Brazil et al., 1986; Brazil e Strominger, 1991; Hetherington et al., 1999; Su et al., 1999).

1.9.1- A função do gene *CD14*

A resposta inflamatória sistêmica pode ser desencadeada por fatores infecciosos e não infecciosos, porém os modelos mais utilizados para a pesquisa são com LPS. A endotoxina LPS, liga-se a um número diferente de carreadores moleculares, sendo o mais importante, a proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com monócitos através dos receptores de superfície celular, que é o CD14 (Wright, 1990). A toxicidade do LPS pode ser inibida interferindo na interação com a LBP ou bloqueando a interação com o receptor CD14.

A glicoproteína CD14 presente na superfície de macrófagos é importante para o reconhecimento de células em apoptose (Devitt et al., 1998).

Segundo Lauener et al. (2002), os filhos de “fazendeiros”, estão diminuindo o risco de desenvolverem alergia. Os resultados de estudos epidemiológicos sugerem que a exposição aumentada a compostos microbianos, pode ser responsável por esse risco reduzido. Lauener et al. (2002) mediram a expressão de receptores de compostos microbianos conhecidos por disparar a resposta imune inata e demonstraram que as células do sangue de crianças de “fazendeiros” expressaram significativamente quantidades maiores de CD14 e receptor Toll-like 2 (TLR2) que as crianças de “não fazendeiros”. Eles propuseram que o sistema imune inato responde a carga microbiana no ambiente e modula o desenvolvimento de doença alérgica.

1.9.2- O gene *CD14*

O gene *CD14* está localizado no cromossomo 5q 31.1, consiste de 3.900 bp e apresenta dois éxons, onde codifica uma proteína de 375 aminoácidos, sendo expresso no limite da membrana de macrófagos, monócitos e neutrófilos (Martin et al., 2005). Baldini et al. (1999) identificaram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região promotora do gene *CD14* (C-159T), que apresenta frequência alélica de aproximadamente 50% em Europeus. Nesse polimorfismo ocorre a transição de C para T na posição -159, e está associado a os níveis circulantes de CD14 na sua forma sérica (Figura 10). Os homozigotos TT apresentam níveis elevados de s(CD14) em relação ao genótipo CC ou CT, e homozigotos TT também apresentam níveis diminuídos de IgE (Baldini et al., 1999). Isso sugere que CD14 apresenta função na regulação da síntese de IgE mediando doenças como a alergia e a asma.

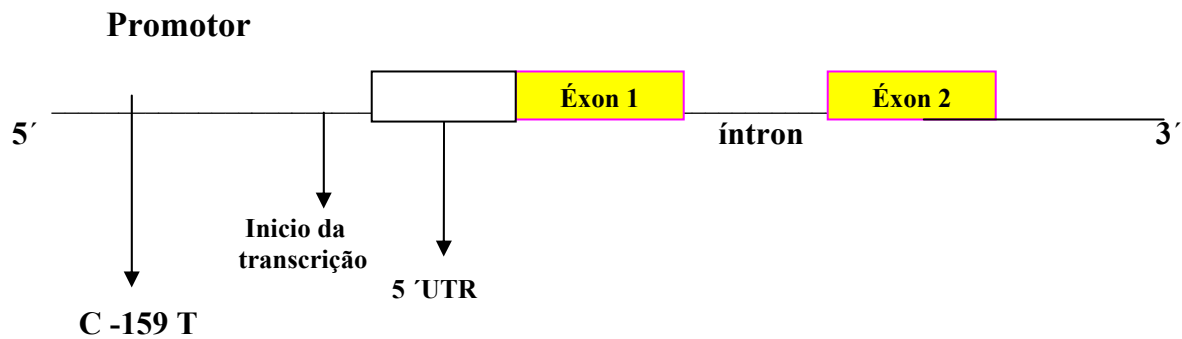


Figura 10- Localização do polimorfismo (C-159T) na região promotora do gene *CD14* (Baldini et al., 1999).

Níveis elevados de CD14 têm sido associados ao aumento da resposta de neutrófilos nas vias aéreas ao LPS (lipopolissacarídeos) (Alexis et al., 2001). O CD14 pode representar uma função na determinação do balanço da infecção e inflamação na Fibrose Cística. O aumento da expressão do CD14 pode estar associado a uma maior inflamação. Um estudo realizado por Martin et al. (2005), mostrou a associação entre o polimorfismo *CD14* – 159CC e a infecção precoce por *Pseudomonas aeruginosa* em crianças fibrocísticas.

Baseado no exposto julgamos de importância a investigação de polimorfismos nos genes *MBL2*, *TGFβ1* e *CD14*, e sua associação ao quadro pulmonar exibido em portadores de Fibrose Cística.

2- OBJETIVOS

- Verificar em uma amostra de pacientes fibrocísticos, uma possível associação entre os polimorfismos do éxon 1 (códon 52, 54 e 57) e região promotora (os haplótipos HY,LY e LX) do gene *MBL2*, o polimorfismo T869C no gene *TGFβ1* e o polimorfismo C-159T no gene *CD14* com a gravidade do quadro pulmonar
- Analisar a presença dos alelos ΔF508 com a gravidade do quadro pulmonar nos paciente fibrocísticos

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram analisados 105 pacientes fibrocísticos em seguimento no Ambulatório multidisciplinar de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Unicamp, coordenado pelos Drs. Antonio Fernando Ribeiro e José Dirceu Ribeiro. Destes, apenas 67 pacientes fibrocísticos apresentavam a classificação clínica de quadro pulmonar.

Para a identificação dos pacientes fibrocísticos foram utilizados o diagnóstico clínico e laboratorial (Anexo 1). Os critérios clínicos foram os testes de suor, manifestações pulmonares e manifestações digestivas. Todos os pacientes foram previamente genotipados quanto ao gene *CFTR* pela equipe do Laboratório de Genética Molecular da Unicamp. O DNA desses pacientes foi extraído e, através da técnica de reação em cadeia da polimerase, regiões específicas foram amplificadas para que pudessem ser analisadas para as cinco mutações em questão: $\Delta F508$, G542X, N1303K, G551D e R553X.

Os pacientes que foram excluídos eram os que não apresentavam as características clínicas da doença, realizado através do teste clínico e laboratorial (Anexo 1).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Unicamp (Anexo 2). O paciente foi informado sobre os objetivos e procedimentos do projeto. Se decidisse participar do projeto deveria assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

O grupo de fibrocísticos estudado foi constituído por 53 homens (50,5%) e 52 mulheres (49,5%) (Gráfico 1), com média de idade de 7,8 e desvio-padrão de 0,71 anos. Com relação ao grupo racial, 101 dos pacientes eram brancos (96%) e 4 pardos (4%) (Gráfico 2).

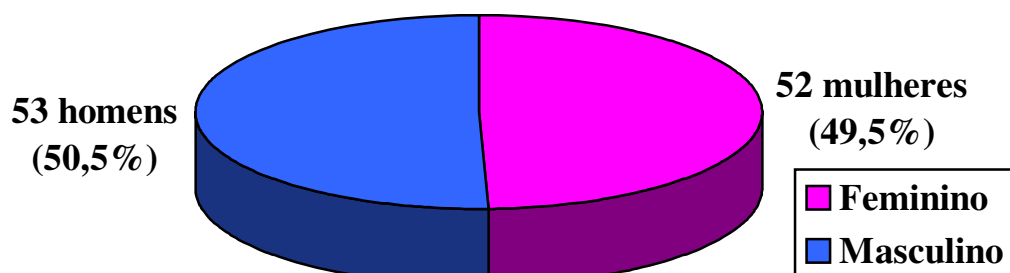


Gráfico 1- Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do ambulatório de Fibrose Cística do departamento de Pediatria da Unicamp, segundo o gênero.

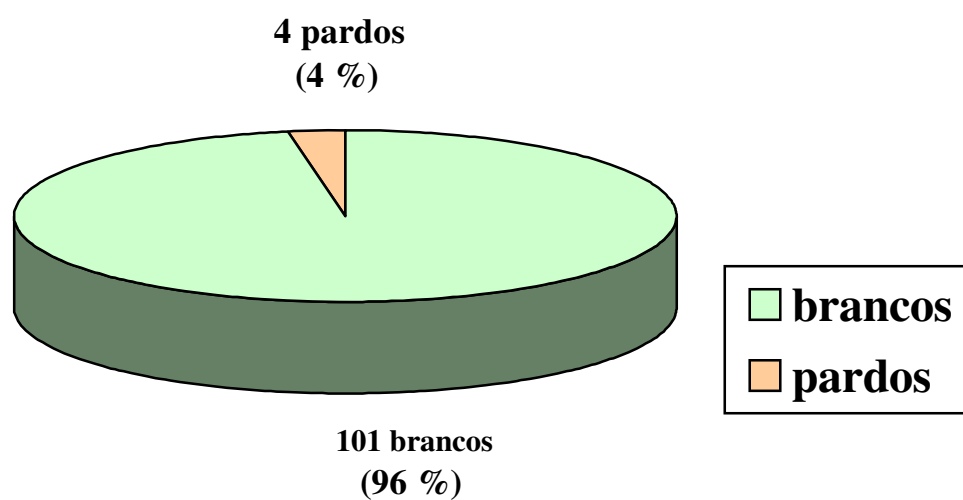


Gráfico 2- Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do Ambulatório de Fibrose Cística do departamento de Pediatria da Unicamp, segundo o grupo racial.

Grupo controle

Foram analisados 202 controles para os polimorfismos no gene *TGF β 1* e *CD14*, com (média = 34 anos, desvio-padrão = 11,3 anos), doadores de sangue da UNICAMP. Com relação ao grupo racial, 160 dos pacientes eram brancos (79,2%), 41 negróides (20,3%) e 1 amarelo (0,5%) (Gráfico 3). O grupo controle estudado foi constituído por 117 homens (58%) e 85 mulheres (42%) (Gráfico 4).

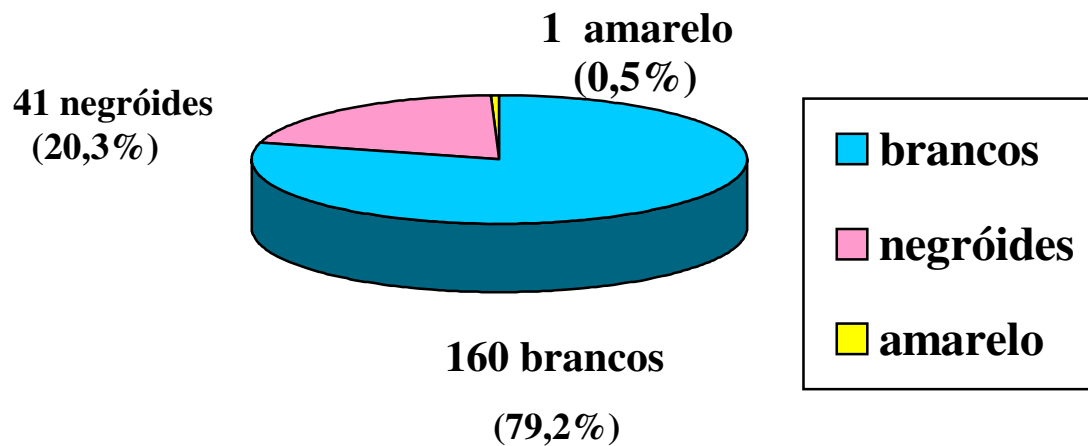


Gráfico 3- Distribuição do grupo controle composto por indivíduos doadores de sangue da Unicamp, quanto ao grupo racial.

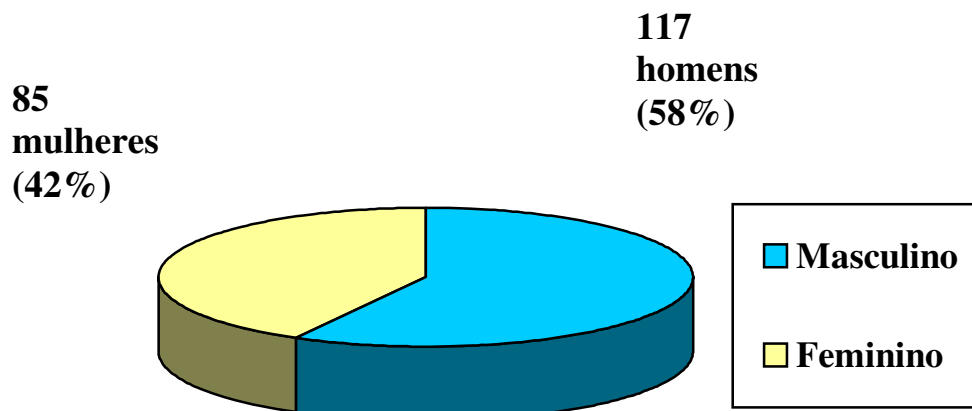


Gráfico 4- Distribuição do grupo controle composto por indivíduos doadores de sangue da Unicamp, quanto ao gênero.

3.1- *MBL2*

Para a análise da Lectina ligadora de Manose (MBL), foi realizada a extração de DNA de leucócitos do sangue periférico, conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986), com algumas modificações.

Dois tubos Vacutainer com cerca de 5 ml de sangue periférico foram coletados, contendo, cada um deles, 54 µl de EDTA a 15% para impedir a coagulação sangüínea. Após 10 min de centrifugação a 2.000 r.p.m. à temperatura ambiente para a separação do plasma e a retirada do mesmo, foram adicionados 5 ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCL 10 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 2 mM) e 125 µl de Triton 100 X; sendo a mistura centrifugada a 2.000 r.p.m. a 4°C por 10 min.

O precipitado de leucócitos formado devido ao processo de centrifugação foi ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 5 ml do mesmo tampão (tampão de lise I), e nova centrifugação foi efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um “pellet” extremamente limpo. Uma vez obtido o “pellet” limpo, este foi ressuspenso em 800 µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM) e 25 µl

de SDS 20%, incubando-se a 55⁰C por 10 min. Após a incubação, foram adicionados 300 µl de NaCl 5M e realizadas duas extrações com 0,5 volume de fenol (previamente equilibrado com Tris-HCl pH 8,0) e 0,5 volume da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) v/v. Após delicada inversão para a mistura homogênea de todos os reagentes, realizou-se a centrifugação a 12.000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente.

Após o processo de extração com fenol/clorofórmio, foram realizadas mais duas lavagens com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em seguida, o DNA foi precipitado da fase aquosa com a adição de 1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado e mantido em freezer, a -20⁰C, por uma hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente. Esta mistura de etanol absoluto e acetato de sódio é invertida de modo a possibilitar a lavagem do “pellet” com 1 ml de etanol 70%, sendo a mistura centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente. Após a retirada do etanol 70%, o “pellet” de DNA foi deixado à temperatura ambiente para secagem.

Uma vez seco, O DNA foi ressuspenso em água MiliQ estéril, em um volume que permitiu à amostra apresentar uma concentração final de aproximadamente 100 ng/µl. Este DNA, agora em água, foi colocado em banho-maria a 37⁰C durante 12 horas para que pudesse entrar em solução. A seguir, o DNA dissolvido foi submetido a gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X e subsequente visualização sob iluminação ultravioleta.

Após a extração de DNA, o método utilizado foi o SSP (seqüência de primers específicos), onde foram realizadas várias reações de amplificação, cada uma delas contendo um iniciador capaz de detectar um grupo de alelos ou um alelo (Steffensen et al., 2000). Através da reação em cadeia da polimerase de seqüência de primers específicos (PCR – SSP), determinamos a genotipagem de 105 indivíduos para as mutações conhecidas na região promotora (H e L na posição 550 e X e Y, na posição 221) e no éxon 1 (códon 52, 54 e 57, que originam três variáveis alelos denominados D, B e C respectivamente). A concentração final dos reagentes foram: 30 pmol (cada primer específico e primers de controle interno); 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP

e dGTP),; 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM KCl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico. Os primers de controle interno do éxon 1 amplificam o gene do hormônio de crescimento e os primers de controle interno da região promotora amplificam o gene *DRB1* (histocompatibilidade classe II)

O programa na máquina de PCR consistiu de:

- 1- 95°C 1 min
- 2- T°C 1 min (variava para cada códon e região promotora)
- 3- 72°C 2 min
- 4- 35 X passos 1 2 e 3
- 5- 72°C 1 min

Na região promotora, os genótipos foram separados em três haplótipos:

HY

LY

LX

Dando origem a seis combinações :

HY/HY, HY/LY, HY/LX, LY/LY, LX/LX, LX/LY

No éxon 1 os polimorfismos nos códons 52, 54 e 57 resultam em diferentes haplótipos que estão enumerados no Quadro 1.

Quadro 1- Polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*, representados pelos seguintes genótipos: **AA** - indivíduo normal; **AO** - indivíduo heterozigoto; **OO** - indivíduo homozigoto ou heterozigoto composto.

	Códon 52		Códon 54		Códon 57	
	D	ABC	B	ACD	C	ABD
AA	-	+	-	+	-	+
BB	-	+	+	-	-	+
CC	-	+	-	+	+	-
DD	+	-	-	+	-	+
AB	-	+	+	+	-	+
AC	-	+	-	+	+	+
AD	+	+	-	+	-	+
BC	-	+	+	+	+	+
BD	+	+	+	+	-	+
DC	+	+	-	+	+	+

A reação de amplificação foi realizada em um aparelho termociclador de temperatura em volume final de 20 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 0,2mM de dNTPs , 20 pmol de cada primer específico e tampão contendo 10 mM Tris – HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0,01% (w/v) de gelatina e 1 U de *Gold Taq polymerase* (Perkin – Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA). Foram usados programas diferentes em cada mistura (Steffensen et al., 2000). A sequência dos primers que foram utilizados na reação da PCR estão presentes no Anexo 4.

As figuras 11, 12 e 13 demonstram géis de agarose 1,5%, provenientes da reação de PCR para a investigação dos polimorfismos no gene da *MBL2*, códons 52, 54 e 57 respectivamente. E as figuras 14, 15, 16 e 17 demonstram géis de agarose 1,5%, provenientes da reação de PCR para a investigação dos polimorfismos na região promotora do gene *MBL2*.

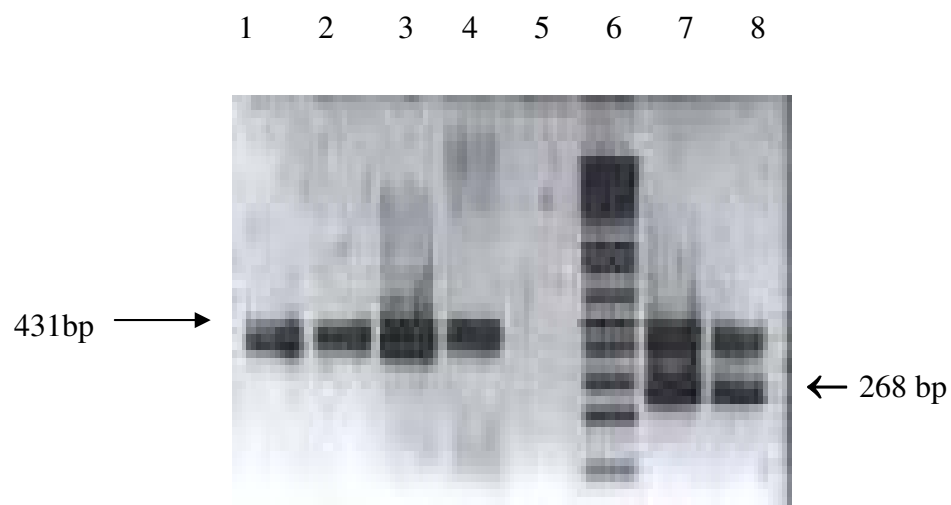


Figura 11- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 52 + 223 D

Colunas 1, 2, 3 e 4 – indivíduos que não apresentam o alelo D, 431bp (banda controle)

Coluna 5 – controle branco (que não possui o DNA)

Coluna 6 – ladder de 100bp

Colunas 7 e 8 – indivíduos que apresentam o alelo D, 268bp

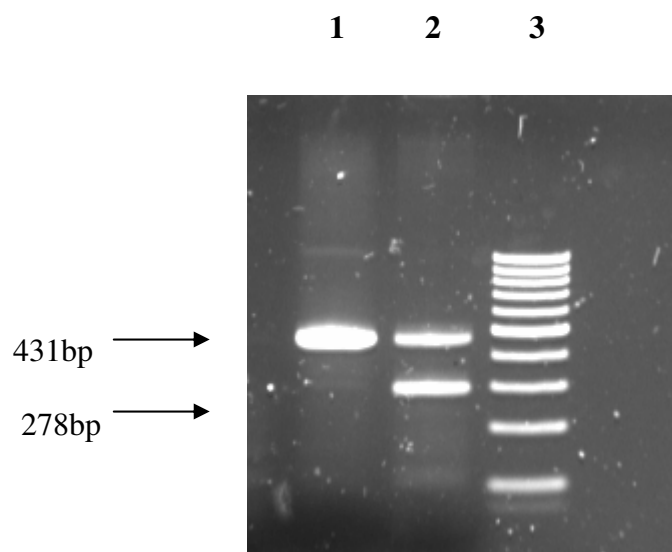


Figura 12- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 54 + 230 B

Coluna 1 - paciente que não apresenta o alelo B , 431bp (banda controle)

Coluna 2 - paciente que apresenta o alelo B, 431bp (banda controle) e 278bp (banda do alelo C)

Coluna 3 - ladder de 100bp

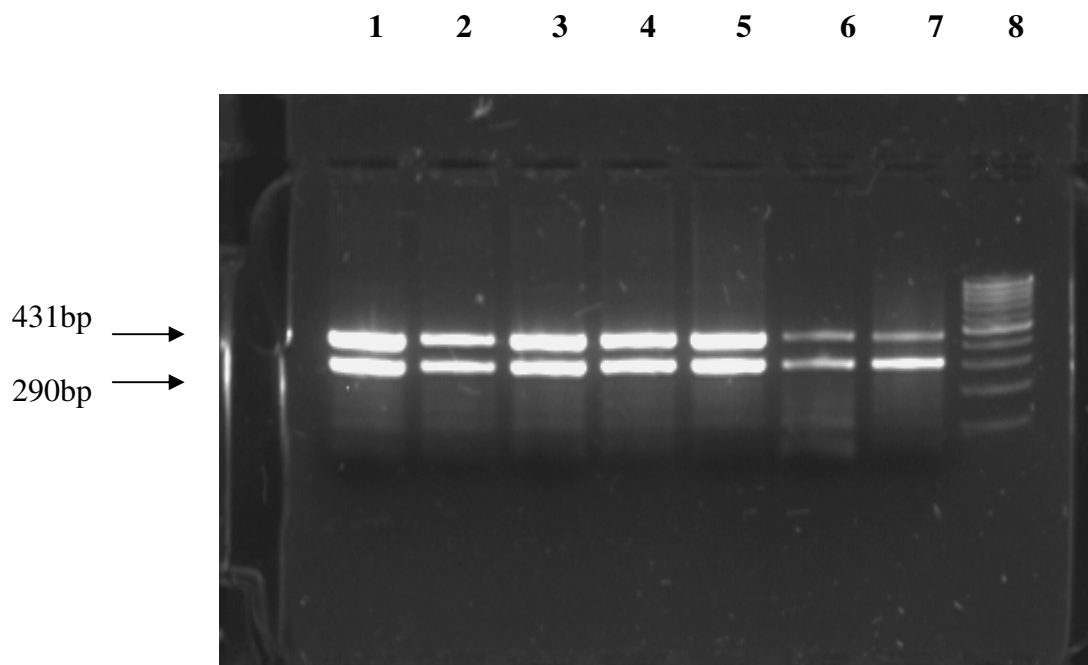


Figura 13- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do polimorfismo no códon 57 + 239 C

Coluna 1 a 7 – pacientes que apresentam o alelo C, 431bp (banda controle) e 290bp (banda do alelo C)

Coluna 8 - ladder de 100bp

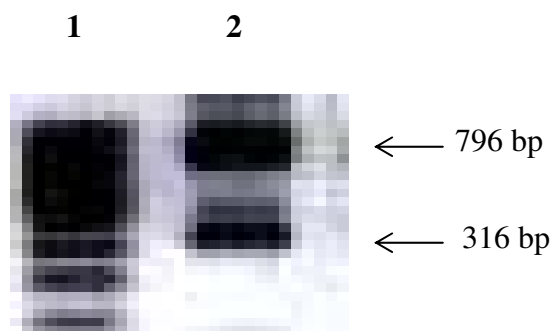


Figura 14- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo H (- 550) na região promotora do gene *MBL2*

Coluna 1 – ladder de 100 bp

Coluna 2 – Indivíduo que apresenta o alelo H (banda de 316 bp) e banda controle (796bp)

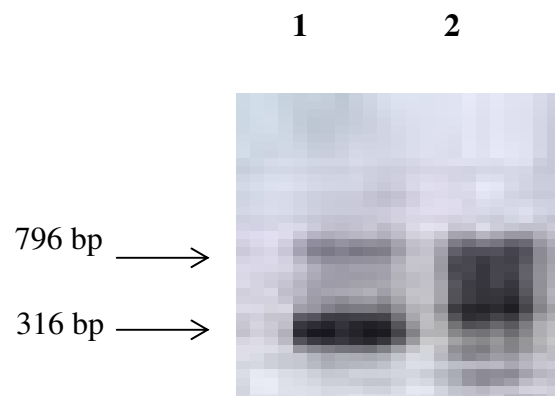


Figura 15- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo L (- 550) na região promotora do gene *MBL2*

Colunas 1 – indivíduo que apresenta o alelo L (316bp) e banda controle (796bp)

Coluna 2 – ladder de 100 bp

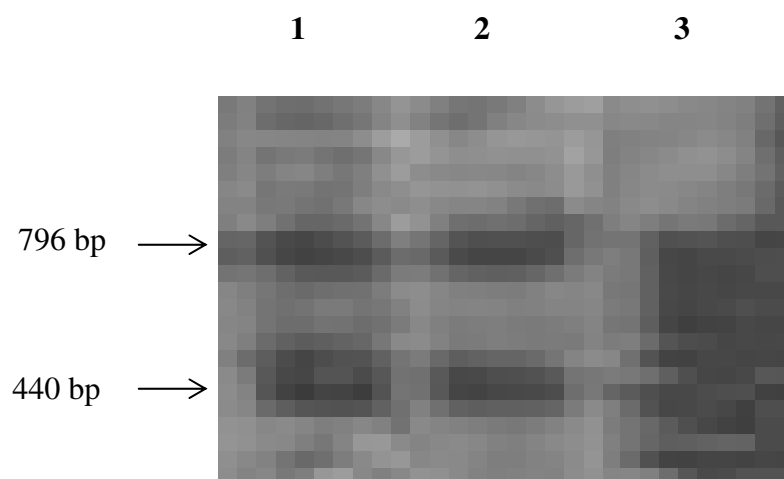


Figura 16- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo X (- 221) na região promotora do gene *MBL2*

Colunas 1 e 2 – indivíduos que apresentam o alelo X (banda de 440 bp) e banda controle de 796 bp

Coluna 3 – ladder de 100bp

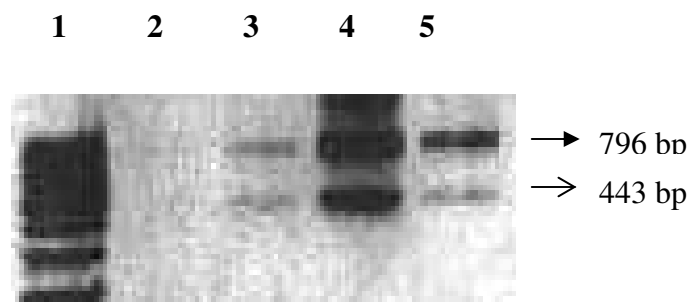


Figura 17- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo Y (- 221) na região promotora do gene *MBL2*

Coluna 1 - ladder de 100 bp

Coluna 2 – controle branco (que não possui o DNA)

Colunas 3, 4 e 5 – indivíduos que apresentam o alelo Y (banda de 443 bp) e banda controle de 796 bp

3.2- *TGF – $\beta 1$*

Foi realizada a extração de DNA de leucócitos do sangue periférico conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986), com algumas modificações. Após a extração de DNA, identificamos o polimorfismo no gene do *TGF- $\beta 1$* , localizado no códon 10, posição + 869, através da técnica de ARMS (Sistema de mutação refratário à amplificação).

A técnica de PCR ARMS foi descrita primeiramente por Newton et al. (1989), e permite o diagnóstico de qualquer mutação conhecida no DNA genômico de forma simples, rápida, confiável, com baixo custo. O ARMS é uma adaptação da PCR, onde mutações conhecidas podem ser identificadas pelo desenho de três “primers”, um específico para o alelo mutante, o outro específico para o alelo selvagem e o terceiro é específico da região flangeadora (conservada) do éxon e que será o “primer” que vai direcionar a amplificação da fita no sentido direto. O desenho foi realizado de maneira que o “primer” específico para o alelo mutante terminou com a base mutada na extremidade 3’ e o “primer” específico para o alelo selvagem terminou com a base normal em sua extremidade 3’, funcionando como uma sonda alelo específica. Portanto, dois “primers” sense foram desenhados com

tamanhos diferentes e extremidades 3' complementares ao alelo normal ou mutado (alelo específicos) e um “primer” anti-sense complementar a ambos alelos, amplificando assim seqüências de tamanhos distintos. Os “primers” utilizados na reação foram (Perrey et al., 1999):

TGF – β 1 Códon 10

Primer geral (sense): 5'- tccgtgggatactgagacac- 3'

Primer C (antisense): 5'- gcagcggtagcagcagcg- 3'

Primer T (antisense): 5'- agcagcggtagcagcagca- 3'

(Produto do PCR = 241bp)

Primer 1 (controle interno): 5'- gccttcccaaccattccctta- 3'

Primer 2 (controle interno): 5'- tcacggattctgtgtgtttc - 3'

(Produto do PCR = 429bp) (Os primers controles amplificam o gene do hormônio de crescimento)

O DNA foi amplificado em um volume final de 50 μ l de reação. A concentração final dos reagentes foram: 30 pmol de cada primer (primer geral, um dos dois primers específicos, primers de controle interno), 200 uM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP),; 1U Taq DNA polimerase; tampão da enzima (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM KCl e 1,5 mM MgCl) e 1 ug de DNA genômico.

O programa na máquina de PCR consistiu de:

- 1- 95°C 1 min
- 2- 63°C 1 min $\Rightarrow$ aleloT
- 3- 72°C 2 min
- 4- 35 X passos 1 2 e 3
- 5- 72°C 1 min

Onde para o alelo C, o primer específico anela na temperatura de 61°C.

Os produtos amplificados para análise dos alelos C e T foram analisados em gel de agarose 1.5% (Figuras 18 e 19).

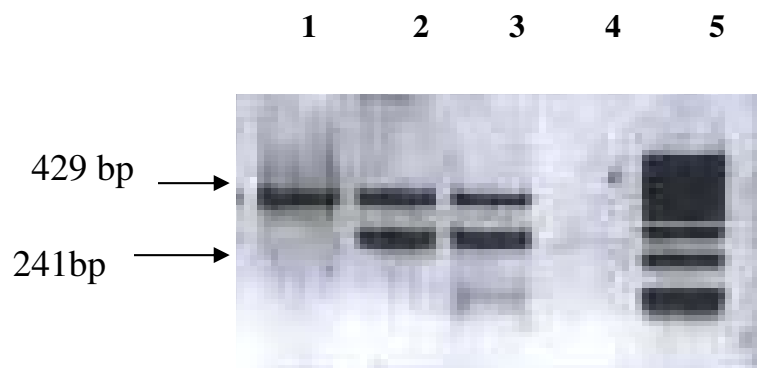


Figura 18- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo C do polimorfismo T869C no gene *TGF-β1*

Coluna 1 – indivíduo que não apresenta o alelo C (apresenta somente a banda controle de 429 bp)

Colunas 2 e 3 – indivíduos que apresentam o alelo C (banda de 241 bp), e mais a banda controle de 429 bp

Coluna 4 – controle branco (que não possui o DNA)

Coluna 5 – ladder de 100 bp

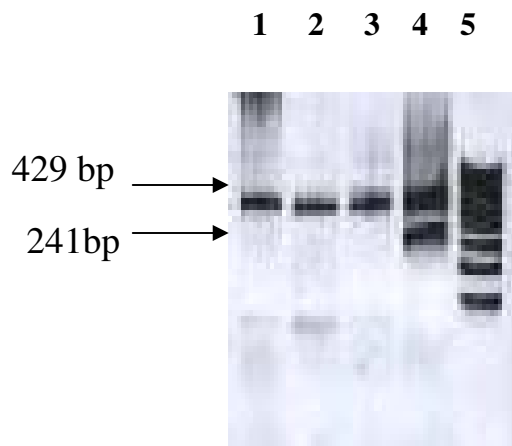


Figura 19- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos amplificados na reação de investigação do alelo T do polimorfismo T869C no gene *TGF- β 1*

Colunas 1, 2 e 3 – indivíduos que não apresentam o alelo T(somente a banda controle de 429bp)

Coluna 4 – indivíduo que apresenta o alelo T (banda de 241 bp) e a banda controle de 429 bp

Coluna 5 – ladder de 100 bp

3.3- *CD14*

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

Após a extração de DNA, a genotipagem do polimorfismo *CD14*/-159 foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Koppelman et al. (2001). A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume de 30 μ l contendo 50 ng de DNA, 250 μ mol/l dNTP, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 10 x tampão, 0,5 U Taq DNA polimerase, e 0,1 μ mol/l do primer sense 5'- GCCTCTGACAGTTTATGTAATC -3' e o primer antisense 5'- GTGCCAACAGATGAGGTTTCAC - 3'. A reação de PCR consistiu de : (1- 95°C por 1min, 2- 58°C por 1min , 3- 72°C por 2min , repete 35 vezes os passos 1, 2 e 3; e uma extensão de 72°C por 1 min . Após a PCR, usamos uma enzima de restrição para digerir o fragmento amplificado com 5 U *AvaII* e 1 μ l de tampão (New England Biolabs Inc,

Beverly, MA) à 37°C por duas horas. O produto foi analisado em gel de agarose 1,5%. A enzima *AvaII* digere o produto da PCR somente quando o alelo T está presente, sendo que o produto não digerido apresenta o fragmento de 497bp e o produto digerido apresenta fragmentos de 144 e 353bp (Figura 20).

Análise de C-159T (CD14)

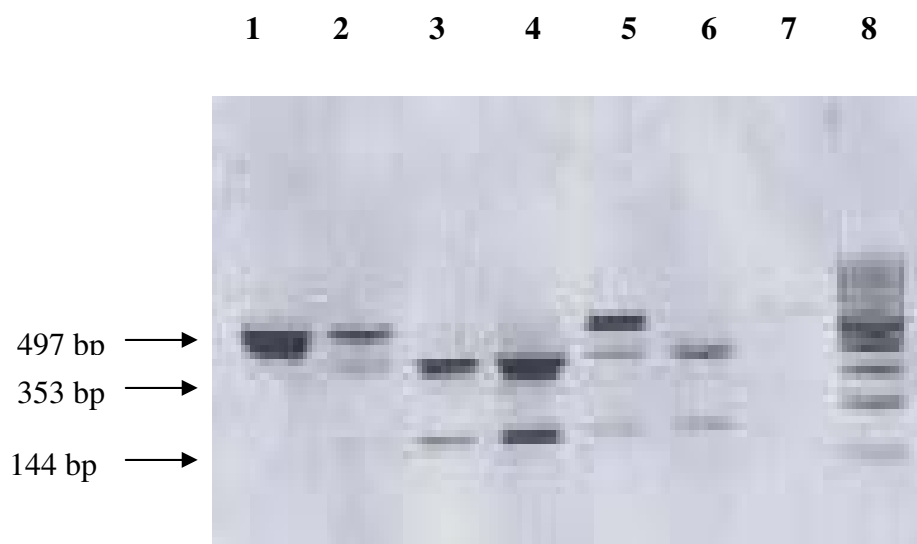


Figura 20- Gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos digeridos pela enzima *AvaII*, na reação de investigação da análise do polimorfismo C-159T do gene *CD14*

Coluna 1 – indivíduo que apresenta o genótipo CC (apresenta somente a banda de 497 bp)

Colunas 2 e 5 – indivíduos que apresentam o genótipo CT (apresentam as bandas de 497 bp, 353 bp e 144 bp)

Colunas 3, 4 e 6 - indivíduos que apresentam o genótipo TT (apresentam as bandas de 353 bp e 144 bp)

Coluna 7- controle branco (que não possui o DNA)

Coluna 8- ladder de 100bp

3.4- Escore de Shwachman

O escore de Shwachman foi utilizado para avaliar a gravidade do quadro clínico. Este escore avalia a atividade física, o exame físico, a nutrição e o quadro radiológico. Para cada item a pontuação máxima é de 25 pontos e quanto menor o valor do escore, mais grave o quadro clínico do paciente. O escore é graduado em excelente (86-100), bom (71-85), médio (56-70), moderado (41-55) e grave (40 ou menos), conforme o número total de pontos (Shwachman e Kulczycki, 1958). O escore de Shwachman encontra-se no Anexo 5.

3.5- Análise dos dados

A análise da associação das variações entre os pacientes fibrocísticos e o grupo controle foram feitas através do teste Qui-Quadrado e “Odds Ratio”. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa quando o p-valor do teste aplicado foi $< 0,05$.

4- RESULTADOS

Polimorfismo no gene *MBL2* (códon 52,54 e 57) (A0)

Com relação à presença dos alelos para mutação $\Delta F508$ e sua comparação com os alelos A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2*, a amostra de pacientes fibrocísticos não está em EWH ($X_{(2)}^2 = 9,95$ $P=0,007$), e não houve um resultado significativo ($P=0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e os alelos A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2*.

No. De alelos delta	A	0
1	48 (48.5%)	66 (65.3%)
2	33 (33.3%)	21 (20.8%)
0	18 (18.2%)	14 (13.9%)
Total	99	101

$X_{(2)}^2 = 5,99$ $P=0,05$

Ao comparar a presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e os genótipos A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2* não houve significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e genótipo A0 dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2*.

No. De alelos delta	AA	A0	00
1	26 (57.8%)	16 (55.2%)	20 (64.5%)
2	11 (24.4%)	11 (37.9%)	5 (16.1%)
0	8 (17.8%)	2 (6.9%)	6 (19.4%)
Total	45	29	31

1 alelo x 2 alelos = $X_{(2)}^2 = 4,05$ $P=0,13$

1 alelo x 0 alelos = $X_{(2)}^2 = 1,17$ $P=0,55$

2 alelos x 0 alelos = $X_{(2)}^2 = 4,26$ $P=0,11$

A distribuição dos alelos A e O dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2* em comparação a gravidade do quadro pulmonar não apresentou diferença significativa, nem com relação à distribuição genotípica AO (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4- Distribuição dos alelos A e O dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.

Alelo	Grave	Moderado	Leve
A	19 (55.9%)	31 (67.4%)	33 (61.1%)
O	15 (44.1%)	15 (32.6%)	21 (38.9%)
Total	34	46	54

$$X_{(2)}^2 = 1,12 \text{ P}=0,57$$

Tabela 5- Distribuição da frequência genotípica AO do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos.

Genótipo	Grave	Moderado	Leve
AA	8 (47%)	13 (56.6%)	13 (48.1%)
AO	3 (17.6%)	5 (21.7%)	7 (25.9%)
OO	6 (35.3%)	5 (21.7%)	7 (25.9%)
Total	17	23	27

$$G \times M = X_{(2)}^2 = 0,90 \text{ P}=0,64$$

$$G \times L = X_{(2)}^2 = 0,63 \text{ P}=0,73$$

$$M \times L = X_{(2)}^2 = 0,35 \text{ P}=0,84$$

Ao comparar a distribuição genotípica dos polimorfismos no códon 52, 54 e 57 do gene *MBL2* quanto ao quadro pulmonar leve e moderado não foi encontrado resultado significativo (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição genotípica AO do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar em fibrocísticos

Genótipo	Leve/moderada	Grave
AA	26 (52%)	8 (47.1%)
AO	12 (24%)	3 (17.6%)
OO	12 (24%)	6 (35.3 %)
Total	50	17

$$X_{(2)}^2 = 0,89 \text{ P}=0,64$$

Polimorfismos H/L e X/Y na região promotora do gene *MBL2*

Com relação à presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ em comparação com os alelos da região promotora do gene *MBL2*, a amostra de pacientes fibrocísticos está em equilíbrio de EHW ($X_{(5)}^2 = 8,82$ $P=0,11$), e não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 7).

Tabela 7- Associação dos alelos da mutação $\Delta F508$ e os alelos da região promotora do gene *MBL2*

Alelo MBL/No. de alelos $\Delta F508$	1	2	0
HY	29 (42.6%)	17 (42.5%)	15 (57.7%)
LY	21 (30.9%)	13 (32.5%)	6 (23.1%)
LX	18 (26.5%)	10 (25%)	5 (19.2%)
Total	68	40	26

1 alelo x 2 alelos = $X_{(2)}^2 = 0,04$ $P=0,97$

1 alelo x 0 alelos = $X_{(2)}^2 = 1,71$ $P=0,42$

2 alelos x 0 alelos = $X_{(2)}^2 = 1,47$ $P=0,48$

Ao comparar a presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e genótipos da região promotora do gene *MBL2*, não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 8).

Tabela 8- Presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ e genótipos da região promotora do gene *MBL2*

Genótipo MBL/No. De alelos $\Delta F508$	1	2	0
HYHY	4 (11.8%)	1 (5%)	4 (30.8%)
HYLY	9 (26.5%)	7 (35%)	2 (15.4%)
HYLX	12 (35.3%)	8 (40%)	5 (38.5%)
LYLY	4 (11.8%)	2 (10%)	2 (15.4%)
LYLX	1 (2.9%)	0	0
LXLX	4 (11.8%)	2 (10%)	0
Total	34	20	13

1 alelo x 2 alelos = $X_{(5)}^2 = 1,67$ $P=0,89$

1 alelo x 0 alelos = $X_{(5)}^2 = 5,52$ $P=0,47$

2 alelos x 0 alelos = $X_{(5)}^2 = 7,45$ $P=0,18$

Quando foi realizada a análise quanto à presença de um e dois alelos para $\Delta F508$ em comparação com a ausência de alelo $\Delta F508$, associados aos genótipos da região promotora do gene *MBL2*, não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 9).

Tabela 9- Comparação da presença de um e dois alelos para $\Delta F508$ em relação à ausência de alelo quanto aos genótipos da região promotora do gene *MBL2*.

Genótipo MBL/No. De alelos $\Delta F508$	1/2	0
HYHY	5 (9.2%)	4 (30.8%)
HYLY	16 (29.6%)	2 (15.4%)
HYLX	20 (37%)	5 (38.5%)
LYLY	6 (11.1%)	2 (15.4%)
LYLX	1 (1.9%)	0
LXLX	6 (11.1%)	0
Total	54	13

$$X_{(5)}^2 = 6,25 \text{ P}=0,28$$

Na análise da distribuição alélica da região promotora do gene *MBL2* com relação à gravidade do quadro pulmonar não houve resultado significativo (Tabela 10).

Tabela 10- Distribuição alélica da região promotora do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar.

Alelo	Grave	Moderado	Leve
HY	18 (50%)	22 (45.8%)	23 (44.2%)
LY	7 (19.4%)	17 (35.4%)	16 (30.8%)
LX	11 (30.6%)	9 (18.8%)	13 (25%)
Total	36	48	52

$$G \times M = X_{(2)}^2 = 3,12 \text{ P}=0,21$$

$$G \times L = X_{(2)}^2 = 1,44 \text{ P}=0,48$$

$$M \times L = X_{(2)}^2 = 0,62 \text{ P}=0,73$$

Ao comparar a distribuição genotípica dos polimorfismos presentes na região promotora do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 11).

Tabela 11- Distribuição da frequência genotípica dos alelos presentes na região promotora do gene *MBL2* por gravidade do quadro pulmonar.

Genótipo	Grave	moderado	Leve
HYHY	2 (11.1%)	2 (8.7%)	5 (19.2%)
HYLY	4 (22.2%)	8 (34.8%)	6 (23.1%)
HYLX	10 (55.5%)	8 (34.8%)	7 (26.9%)
LYLY	1 (5.6%)	4 (17.4%)	3 (11.5%)
LYLX	1 (5.6%)	1 (4.3%)	4 (15.4%)
LXLX	0	0	1 (3.8%)
Total	18	23	26

$$G \times M = X_{(4)}^2 = 2,79 \text{ P}=0,59$$

$$G \times L = X_{(5)}^2 = 4,72 \text{ P}=0,45$$

$$M \times L = X_{(5)}^2 = 4,41 \text{ P}=0,49$$

A análise da distribuição da frequência genotípica dos polimorfismos presentes na região promotora do gene *MBL2*, separados por gravidade do quadro pulmonar em leve e moderada com relação ao quadro pulmonar grave, não houve resultado estatisticamente significativo (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição genotípica dos polimorfismos presentes na região promotora do gene *MBL2*, separados por gravidade do quadro pulmonar em leve e moderada com relação a quadro pulmonar grave.

Genótipo	Leve/Moderada	Grave
HYHY	7 (14.3%)	2 (11.1%)
HYLY	14 (28.6%)	4 (22.2%)
HYLX	15 (30.6%)	10 (55.5%)
LYLY	7 (14.3%)	1 (5.6%)
LYLX	5 (10.2%)	1 (5.6%)
LXLX	1 (2%)	0
Total	49	18

$$X_{(5)}^2 = 4,02 \text{ P}=0,54$$

Polimorfismo T 869C no gene *TGFβ1*

Com relação ao polimorfismo T869C no gene *TGFβ1*, a amostra de pacientes fibrocísticos não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($X_{(2)}^2 = 21,24$ $P=0,000024$). A amostra controle está em EHW ($X_{(2)}^2 = 10,58$ $P=0,005$), quando foi feita a comparação alélica dos pacientes fibrocísticos e o grupo controle, não se observou diferença significativa (Tabela 13)

Tabela 13- Comparação da frequência alélica do polimorfismo T869C no gene *TGFB1* em pacientes fibrocísticos e o grupo controle.

Alelo	Pacientes	Controle
T	117 (55.7%)	218 (54%)
C	93 (44.3 %)	186 (46%)
Total	210	404

$$X_{(1)}^2 = 0,17 \text{ } P=0,67 \text{ } OR=1,07 \text{ } (0,76-1,52)$$

Com relação ao polimorfismo T869C no gene *TGFβ 1*, quando foi realizada a comparação genotípica dos pacientes fibrocísticos e o grupo controle, foi observado uma diferença significativa, com relação aos genótipos TC e CC, sendo o genótipo TC um fator de risco na amostra ($P= 0,01$; $OR= 2,00$ (1,11-3,61)) (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação genotípica dos pacientes fibrocísticos e grupo controle para o polimorfismo T869C no gene *TGFB1*.

Genótipo	Amostra	Controle	X^2	P	OR
TT	17 (16.2%)	43 (21.3%)	1,14	0,28	0,71 (0,37-1,38)
TC	83 (79.04%)	132 (65.3%)	6,18	0,01	2,00(1,11-3,61)
CC	5 (4.76%)	27 (13.4%)	5,48	0,01	0,32 (0,11-0,92)
Total	105	202			

$$X_{(2)}^2 = 7,68 \text{ } P=0,02$$

Ao analisar a comparação do número de alelos da mutação $\Delta F508$ quanto ao polimorfismo T869C no gene *TGFB1*, não houve diferença significativa (Tabela 15).

Tabela 15- Comparação da presença da mutação $\Delta F508$ quanto ao polimorfismo T869C no gene *TGFB1*.

No. De alelos $\Delta F508$	TT	TC	CC
1	2 (20%)	31 (57.4%)	1 (33.3%)
2	5 (50%)	13 (24.1%)	2 (66.7%)
0	3 (30%)	10 (18.5%)	0 (0%)
Total	10	54	3

1 alelo x 2 alelos = $X_{(2)}^2=5,74$ P=0,05

1 alelo x 0 alelos = $X_{(2)}^2=3,21$ P=0,20

2 alelos x 0 alelos = $X_{(2)}^2=1,47$ P=0,47

Ao comparar a distribuição alélica do polimorfismo T869C no gene *TGF β 1* em fibrocísticos quanto à gravidade do quadro pulmonar com o grupo controle, não houve diferença estatística (Tabela 16).

Tabela 16- Distribuição da frequência alélica por gravidade do quadro pulmonar quanto ao polimorfismo T869C no gene *TGFB1*.

Alelo	Grave	Moderado	Leve	Controle
T	19 (52.8 %)	26 (56.5 %)	29 (55.8 %)	218 (54 %)
C	17 (47.2 %)	20 (43.5 %)	23 (44.2 %)	186 (46 %)
Total	36	46	52	404

$X_{(3)}^2=0,19$ P=0,97

Com relação à distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene *TGF β 1* nos indivíduos controle comparados com a gravidade do quadro pulmonar nos fibrocísticos, houve apenas um resultado significativo com relação ao quadro pulmonar leve. O genótipo TC (P= 0,01 OR= 4,07 (1,16-21,78)), apresentou um fator de risco para o quadro pulmonar leve nos fibrocísticos (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17- Distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene *TGFBI* quanto à gravidade do quadro pulmonar.

Genótipo	Grave	Moderado	Leve	Controle
TT	2 (11.1 %)	5 (21.7 %)	3 (11.5 %)	43 (21.3 %)
TC	15 (83.3 %)	16 (69.6 %)	23 (88.5 %)	132 (65.3 %)
CC	1 (5.5 %)	2 (8.7 %)	-	27 (13.4 %)
Total	18	23	26	202

$$G \times C = X_{(2)}^2 = 2,43 \text{ P}=0,29$$

$$M \times C = X_{(2)}^2 = 0,41 \text{ P}=0,81$$

$$L \times C = X_{(2)}^2 = 6,37 \text{ P}=0,04$$

$$G \times M = X_{(2)}^2 = 1,06 \text{ P}=0,59$$

$$G \times L = X_{(2)}^2 = 1,48 \text{ P}=0,47$$

$$M \times L = X_{(2)}^2 = 3,59 \text{ P}=0,16$$

Tabela 18- Comparação da distribuição genotípica do quadro pulmonar leve com o grupo controle quanto ao polimorfismo T869C no gene *TGFBI*.

Genótipo	Leve	Controle	X ²	P	OR (IC)
TT	3 (11.5%)	43 (21.3%)	1,36	0,24	0,48 (0,09 -1,72)
TC	23 (88.5%)	132 (65.3%)	5,65	0,01	4,07 (1,16-21,78)
CC	-	27 (13.4%)	2,77	0,09	0,0 (0-1,07)
Total	26	202			

Ao comparar a distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene *TGFBI* quanto à classificação do quadro pulmonar leve e moderado com relação ao grave, não houve um resultado significativo (P=0,84) (Tabela 19).

Tabela 19- Distribuição genotípica do polimorfismo T869C no gene *TGFBI* , quanto ao quadro pulmonar.

Genótipo	Leve/moderada	Grave
TT	8 (16.3%)	2 (11.1%)
TC	39 (79.6%)	15 (83.3%)
CC	2 (4.1%)	1 (5.6%)
Total	49	18

$$X_{(2)}^2 = 0,33 \text{ P}=0,84$$

Polimorfismo C-159T no gene *CD14*

Com relação ao polimorfismo C-159T do gene *CD14*, a amostra de pacientes fibrocísticos está em EWH ($X_{(2)}^2 = 4,38$ $P=0,11$). A amostra controle não está em EWH ($X_{(2)}^2 = 18,72$ $P=0,00008$). Ao analisar a comparação alélica dos pacientes e grupo controle quanto ao polimorfismo C159T no gene *CD14*, houve um resultado significativo ($P=0,01$) (Tabela 20).

Tabela 20- Comparação da frequência alélica do polimorfismo C159T no gene *CD14* dos pacientes e grupo controle.

Alelo	Pacientes	Controle
T	99 (47,1%)	147 (36.4%)
C	111 (52.9%)	257 (63.6%)
Total	210	404

$X_{(2)}^2 = 6,22$ $P=0,01$ $OR=1,56$ (1,09-2,22)

Ao realizar a comparação genotípica entre o grupo de pacientes fibrocísticos e o grupo controle quanto ao polimorfismo C159T no gene *CD14* foi encontrada diferença significativa com relação ao genótipo TT, sendo que esse genótipo apresentou um fator de risco na amostra ($P= 0,001$ $OR= 4,36$ (1,68-12,16)) (Tabela 21).

Tabela 21- Comparação genotípica das amostras dos pacientes e grupo controle para o polimorfismo C159T no gene *CD14*.

Genótipo	Amostra	Controle	X^2	P	OR
TT	16 (15.2%)	8 (4%)	10,68	0,001	4,36 (1,68-12,16)
CT	67 (63.8%)	131 (64.9 %)	0,03	0,85	0,96 (0,57-1,62)
CC	22 (21%)	63 (31.1%)	3,62	0,05	0,58 (0,32-1,05)
Total	105	202			

$X_{(2)}^2 = 13,87$ $P=0,0009$

Com relação à presença dos alelos da mutação $\Delta F508$ comparados aos genótipos do polimorfismo C159T no gene *CD14*, não foi descrito significância estatística (Tabela 22).

Tabela 22- Associação entre os alelos da mutação $\Delta F508$ e os genótipos do polimorfismo C159T no gene *CD14*.

No. De alelos delta	TT	CT	CC
1	2 (33.3%)	23 (51.1%)	9 (56.3%)
2	4 (66.7%)	11 (24.4%)	5 (31.2%)
0	-	11 (24.4%)	2 (12.5%)
Total	6	45	16

1 alelo x 2 alelos = $X_{(2)}^2=2,59$ P=0,27

1 alelo x 0 alelos = $X_{(2)}^2=1,63$ P=0,44

2 alelos x 0 alelos = $X_{(2)}^2=3,98$ P=0,13

Ao comparar a distribuição alélica do polimorfismo C159T no gene *CD14* e a gravidade do quadro pulmonar nos portadores de Fibrose Cística, não foi encontrada significância estatística (Tabela 23).

Tabela 23- Distribuição da frequência alélica do polimorfismo C159T no gene *CD14* e a gravidade do quadro pulmonar nos pacientes fibrocísticos.

Alelo	Grave	Moderado	Leve	Controle
T	16 (44.4%)	20 (43.5%)	21 (40.4%)	147 (36.4%)
C	20 (55.6%)	26 (56.5%)	31 (59.6%)	257 (63.6%)
Total	36	46	52	404

$X_{(3)}^2=1,79$ P=0,61

Ao comparar a distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene *CD14* por gravidade do quadro pulmonar nos indivíduos fibrocísticos, não foi encontrada diferença significativa (Tabela 24).

Tabela 24- Distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene *CD14* entre os indivíduos controle e a gravidade da doença nos fibrocísticos.

Genótipo	Grave	Moderado	Leve	Controle
TT	1 (5.5%)	3 (13%)	2 (7.7%)	8 (4%)
CT	14 (77.8%)	14 (60.9%)	17 (65.4%)	131 (64.9%)
CC	3 (16.7%)	6 (26%)	7 (27%)	63 (31.1%)
Total	18	23	26	202

$$G \times C = X_{(2)}^2 = 1,68 \text{ P}=0,43$$

$$M \times C = X_{(2)}^2 = 3,71 \text{ P}=0,15$$

$$L \times C = X_{(2)}^2 = 0,87 \text{ P}=0,64$$

$$G \times M = X_{(2)}^2 = 1,41 \text{ P}=0,49$$

$$G \times L = X_{(2)}^2 = 0,80 \text{ P}=0,67$$

$$M \times L = X_{(2)}^2 = 0,39 \text{ P}=0,82$$

Com relação à distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene *CD14*, quando comparamos o quadro pulmonar leve e moderado com relação ao grave, não foi encontrada diferença significativa (Tabela 25).

Tabela 25- Distribuição genotípica do polimorfismo C159T no gene *CD14* em pacientes fibrocísticos quanto ao quadro pulmonar leve e moderado versus pulmonar grave.

Genótipo	Leve/moderada	Grave
TT	5 (10.2%)	1 (5.5%)
CT	31 (63.3%)	14 (77.8%)
CC	13 (26.5%)	3 (16.7%)
Total	49	18

$$X_{(2)}^2 = 1,27 \text{ P}=0,53$$

Ao comparar a presença dos alelos $\Delta F508$ associado à gravidade do quadro pulmonar, houve significância estatística ao comparar a presença de um alelo para a mutação $\Delta F508$ com a presença de dois alelos com relação ao quadro pulmonar moderado e grave, havendo um fator de risco no quadro pulmonar moderado com relação à presença dos dois alelos $\Delta F508$ ($P=0,02$; $OR= 3,82$ (1-14,79)) (Tabelas 26 e 27). Quando comparou a presença de dois alelos $\Delta F508$ e a ausência dos alelos $\Delta F508$ com relação ao quadro pulmonar, houve resultado estatisticamente significativo no quadro pulmonar grave, sendo que nesse quadro pulmonar a ausência dos alelos $\Delta F508$, representou um fator de risco ($P=0,01$; $OR=16,29$ (1,43-787,09)) (Tabelas 26 e 28).

Tabela 26- Presença dos alelos $\Delta F508$ e a gravidade do quadro pulmonar nos pacientes fibrocísticos.

Quadro pulmonar/alelos $\Delta F508$	1	2	0
Grave	11 (32.4%)	1 (5%)	6 (46.1%)
moderado	8 (23.5%)	11 (55%)	4 (30.8%)
Leve	15 (44.1%)	8 (40%)	3 (23.1%)
Total	34	20	13

1 alelo x 2 alelos = $X_{(2)}^2=7,83$ $P=0,02$

1 alelo x 0 alelos = $X_{(2)}^2=1,78$ $P=0,41$

2 alelos x 0 alelos = $X_{(2)}^2=7,99$ $P=0,01$

Tabela 27- Comparação da presença de um alelo $\Delta F508$, com relação à presença de dois alelos $\Delta F508$, quanto à gravidade do quadro pulmonar.

Quadro pulmonar/alelos $\Delta F508$	1	2	X^2	P	OR
Grave	11 (32.4%)	1 (5%)	3,98	0,04	0,11 (0-0,91)
Moderado	8 (23.5%)	11 (55%)	5,12	0,02	3,82 (1-14,79)
Leve	15 (44.1%)	8 (40%)	0,09	0,76	0,84 (0,24-2,99)
Total	34	20			

Tabela 28 - Comparação da presença de dois alelos $\Delta F508$, com relação à ausência do alelo $\Delta F508$, quanto à gravidade do quadro pulmonar.

Quadro pulmonar/alelos delta	2	0	X²	P	OR
Grave	1 (5%)	6 (46.1%)	5,71	0,01	16,29 (1,43-787,09)
moderado	11 (55%)	4 (30.8%)	1,87	0,17	0,36 (0,06-1,93)
Leve	8 (40%)	3 (23.1%)	1,02	0,31	0,45 (0,06-2,63)
Total	20	13			

5- DISCUSSÃO

O curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão relacionados com o genótipo *CFTR*. A doença pulmonar pode ser influenciada por fatores ambientais como a idade do paciente, o estado pancreático, estado nutricional, história de fumo e colonização por bactérias (Mahadeva e Lomas, 2000). Bem como pode ser influenciada por fatores genéticos, como genes modificadores que estão fora do locus da Fibrose Cística.

Nos polimorfismos em que a amostra controle não se encontra em equilíbrio de Hardy - Weinberg, acredita-se que se deva ao fato de que na Lei de Hardy - Weinberg preconiza-se uma população ideal, sem pressão seletiva. Nos casos dos polimorfismos estudados, por interferirem em mecanismos relacionados com a inflamação, é possível que determinados genótipos devam sofrer uma pressão seletiva e com isso, a distribuição genotípica não seguiu a lei de Hardy-Weinberg.

Na análise da gravidade do quadro pulmonar e a presença de alelos $\Delta F508$, verificamos uma diminuição de homozigotos entre os pacientes com quadro grave, demonstrando não existir associação entre homozigoto $\Delta F508$ e a gravidade do quadro pulmonar.

Com relação aos polimorfismos no gene *MBL2*, Gabolde et al. (1999) descreveram 11 indivíduos adultos deficientes para MBL com o genótipo (O/O), e relataram que nesses pacientes a deficiência de MBL estava associada à piora significativa da função pulmonar, sendo que nenhuma desvantagem foi associada aos heterozigotos. Contrariamente, Garred et al. (1999), relataram que cada um dos dois genótipos A/O ou O/O no gene *MBL2* estavam associados à piora da função pulmonar. Os resultados de Davies et al. (2004) estão de acordo com Gabolde et al. (1999), demonstrando claramente em grupo grande de indivíduos adultos heterozigotos, a função pulmonar normal. Do mesmo modo Yarden et al. (2004) encontraram que os homozigotos AA, apresentam um melhor fenótipo pulmonar quando comparados aos heterozigotos AO e homozigotos OO. No locus Y/X, foram considerados os genótipos AA-YY e AA-YX como os que apresentaram melhor função pulmonar quando relacionados aos genótipos AA-XX, AO-XY, AO-XX e OO-YY. Garred et al. (1999) demonstraram que pacientes com o genótipo XA/O e O/O estavam no grupo de indivíduos que apresentavam insuficiência de

MBL, comparados com os indivíduos A/A e YA/O, os quais não apresentaram insuficiência de MBL. A função pulmonar de pacientes com insuficiência para MBL é reduzida em relação a pacientes que não apresentam insuficiência.

Segundo Olensen et al. (2006) somente o genótipo OO é definido por apresentar deficiência de MBL. Especialmente o genótipo XA, é tratado diferentemente. Indivíduos com o genótipo XA/O apresentam níveis diminuídos de MBL. Em contraste com Garred et al. (1999) e Davies et al. (2004), não foi encontrada diferença na função pulmonar em adultos, quando o genótipo XA/YO foi comparado ao genótipo A/O ou AA.

De acordo com a literatura, a MBL liga a *Burkholderia cepacia*, mas não a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que a deficiência de MBL pode predispor a infecção por *Burkholderia cepacia*. Contudo, resultados recentes demonstraram uma ligação específica também a *Pseudomonas aeruginosa* (Olensen et al., 2006).

Segundo Muhlebach et al. (2006), a deficiência de MBL está relacionada à gravidade do quadro pulmonar somente em pacientes fibrocísticos adolescentes com idade maior de 15 anos. Nesses pacientes, o hormônio de crescimento pode afetar significativamente o nível de MBL na circulação. Esse estudo revelou uma importância significativa na idade e no desenvolvimento físico dos pacientes fibrocísticos no entendimento da relação entre MBL e a função pulmonar na Fibrose Cística. Mais estudos são necessários para confirmar se a deficiência de MBL na infância contribui significativamente para a gravidade da doença pulmonar na adolescência, a qual seria uma justificativa importante para a MBL ser usada como terapia em pacientes fibrocísticos.

Em nossa casuística, os polimorfismos do gene *MBL2* não estiveram associados à gravidade do quadro pulmonar em pacientes fibrocísticos. De acordo com o estudo realizado por Muhlebach et al. (2006), uma hipótese para os nossos resultados, é o fato da maioria de nossos pacientes apresentarem idade menor que 15 anos, onde a deficiência de MBL não liderou o agravamento do quadro pulmonar.

É aceito que múltiplos fatores genéticos possam influenciar a resposta a qual a deficiência de MBL desempenha como função, devido aos alelos variáveis de MBL. O mecanismo através do qual a MBL atua na Fibrose Cística, ainda não está claro. Entretanto

a MBL exerce um entendimento complexo e incompleto de função na resposta inflamatória.

Com relação ao polimorfismo T869C no gene *TGFβ1*, Arkwright et al. (2000), descreveram que pacientes fibrocísticos portadores do genótipo T/T no códon 10 do gene *TGFβ1* apresentaram um risco elevado para a doença pulmonar, mas Drumm et al. (2005) observaram que o genótipo C/C é o que apresentava risco elevado para a deterioração da função pulmonar. Wojnarowski et al. (1999) encontraram que a produção elevada de TGFβ1 em pacientes fibrocísticos está associada à doença pulmonar leve.

Brazova et al. (2006) não encontraram associação entre os polimorfismos no gene *TGFβ1* e a infecção por bactérias, mas encontraram correlação entre cada infecção e a produção de TGFβ1. Problemas clínicos associados à produção diminuída de TGFβ1 em pacientes fibrocísticos colonizados com a bactéria *Burkholderia cepacia* e a produção elevada de TGFβ1 em pacientes fibrocísticos colonizados por *Pseudomonas aeruginosa*, provam a importância do balanço na produção dessa citocina regulatória em acordo com a função de devastação da infecção crônica.

Em nosso estudo, encontramos apenas associação do heterozigoto TC com o quadro pulmonar leve, ao comparar com o grupo controle.

A variação encontrada nos estudos relacionados aos genótipos de *TGFβ1* e a gravidade do quadro pulmonar, pode ser causada pelas diferenças entre os grupos estudados e o tamanho das amostras. Segundo Brazova et al. (2006), as diferenças encontradas em seus estudos, podem estar relacionadas ao tipo de material analisado, uma vez que estudaram células de sangue periférico e não de um tecido mais específico como as células epiteliais do tecido pulmonar, as quais foram estudados por Schwarz et al. (2003).

Com relação ao polimorfismo C159T no gene *CD14*, Martin et al. (2005) demonstraram associação entre o polimorfismo CD14-159CC e uma colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* em crianças fibrocísticas. Essas crianças apresentaram nível diminuído de CD14 solúvel no plasma, bem como uma resposta pró-inflamatória inadequada. Nesse estudo, a falta de associação entre o polimorfismo CD14 C-159T e os

níveis de CD14 solúvel no plasma, pode refletir um número pequeno de sujeitos nessa população, mas pode indicar também que a Fibrose Cística apresenta fatores mais críticos que o polimorfismo C-159T do CD14, na determinação dos níveis de CD14 solúvel no plasma.

Embora crianças com níveis elevados de CD14 solúvel no plasma possam ser relativamente protegidas de uma colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa*, ao se tornarem colonizadas, elas podem paradoxicamente ter uma resposta pior, como resultado de uma resposta inflamatória agressiva e ineficaz.

Em nosso estudo obtivemos um acúmulo de pacientes com o genótipo TT, mas não houve uma discriminação com relação à gravidade do quadro pulmonar.

Segundo Martin et al. (2005), o aumento na expressão de CD14 pode estar associado ao aumento da inflamação, mas uma redução na quantidade de bactérias, e uma menor expressão de CD14 podem resultar em diminuição da inflamação, mas em uma quantidade elevada de bactérias.

6- CONCLUSÃO

- Em nosso estudo, não foi demonstrada associação entre os polimorfismos do gene *MBL2* e a gravidade do quadro pulmonar em pacientes fibrocísticos;
- Foi descrita uma associação entre o genótipo TC do polimorfismo T869C (TGF- β 1) e o quadro pulmonar leve nos fibrocísticos;
- Com relação ao gene CD14, o genótipo TT parece ser um fator de risco para o quadro pulmonar, mas não um fator modulador da gravidade;
- Em nossa casuística, não existiu associação entre pacientes homozigotos para a mutação Δ F508 e a gravidade do quadro pulmonar.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ahuja S, Paliogianni F, Yamada H, et al. Effect of transforming growth factor- β on early and late activation events in human T cells. *J Immunol* 1993; 150: 3109-3118.

Alberts B. Cellular and molecular immunology. 3.ed. Philadelphia: Saunders,1994. 192p.

Alexis N, Eldridge M, Reed W. CD14-dependent airway neutrophil response to inhaled LPS: role of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 31-35.

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.

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

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

Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, et al. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 459-62.

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

Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014-20.

Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 976-83.

Baranov VS, Ivashenko T, Bakay B. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and other multifactorial diseases. Hum Genet 1996; 97: 517-520.

Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor β in lung development and disease. Chest 2004; 125: 754-765.

Barton DE, Foellmer BE, Du J, et al. Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors β 2 e β 3 in man and mouse : dispersion of TGF β gene family. Oncogen Res 1988; 3: 323-331.

Bear CE, LI C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjee Singh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Cell 1992; 68: 809.

Bienvenu T. Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la muviscidose. Ann Biol Clin 1997;55: 113-121.

Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 207-213.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Mechanisms of disease : Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. N Engl J Med 2000; 342(18) : 1350-58.

Boldt ABW, Culpi L, Tsuneto LT, Souza IR, Kun JFJ, Petzl-Erler ML. Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus. Human Immunology 2006; 67:722-34.

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

Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR- related diseases. Curr Opin Pulm Med 2003; 9: 498-503.

Boyle MP. Strategies for identifying modifier genes in cystic fibrosis. Proc Am Thorac Soc 2007; 4: 52-7.

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

Brazil V, Horejsi V, Baudys M, Kristofova H, Strominger JL, Kostka W, et al. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. Eur J Immunol 1986; 16: 1583.

Brazil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. J Immunol 1991; 147:1567.

Brazova J, Sismova K, Vavrova V, Bartosova J, Macek M, Lauschman H, et al. Polymorphisms of TGF-beta1 in cystic fibrosis patients. Clinical Immunology 2006; 121: 350-357.

Butter GS, Sim D, Tam E, Devine D, Overall CM. Mannose-binding lectin (MBL) mutants are susceptible to matrix metalloproteinase proteolysis. J Biol Chem 2002; 277 (20): 17511-19.

Cambien F, Ricards S, Troesh A. Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Hypertension 1996; 28: 881-7.

Carlsson M, Sjöholm A G, Eriksson L, Thiel S, Jensenius J C, Segelmark M, Truedsson L. Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. Clinical and Experimental Immunology 2004; 139: 306-13.

Casanova JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity: friend, foe, or both? J Exp Med 2004; 199: 1295-99.

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

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

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, et al. Diverse cellular TGF β 1 and TGF β 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J* 1996; 9: 2501-507.

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. A population-based study of morbidity and mortality in mannose- binding lectin deficiency. *J Exp Med* 2004; 199: 1391-99.

Davidson DJ, Porteous DJ. The Genetics of cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1998; 53: 389-397.

Davies JC, Griensenbach U, Alton E. Modifiers genes in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 2005; 39: 383-391.

Davies JC, Turner MW, Klein N. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated *MBL2* alleles. *Eur Respir J* 2004; 24: 798-804.

Davis PB, Drumm M, Konstan MK. Cystic fibrosis. *Am J Crit Care Med* 1996; 154: 1229-56.

De Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, et al. Transforming growth factor β 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1951-57.

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

Devitt A, Moffat OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 1998; 392:505-509.

Di Sant'agnese PA, Darling R C, Perrera GA, Shea, E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics* 1953; 12 :549.

- Dork T, Wulbrand U, Richter T. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 1991; 87: 441- 446.
- Doull IJ. Recents advances in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2001; 85: 62-66.
- Downing I, Koch C, Kilpatrick DC. Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin. *Immunology* 2003; 109: 360-4.
- Drumm ML. Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir Res* 2001; 2:125-128.
- Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1443-53.
- Durieu I, Peyrol S, Gindre D, Bellon G, Durand DV, Pacheco Y. Subepithelial fibrosis and degradation of the bronchial extracellular matrix in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 580-88.
- Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1496-505.
- El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, Musser JM, Graviss EA. The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. *Scand J Infect Dis* 2004; 36 (2) : 106-8.
- Elssner A, Jaumann F, Dobmann S, et al. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor β in bronchioalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome : proinflammatory role of bronchial ephitelial cells. *Transplantation* 2000; 70: 362-67.
- Ernst RK, D'Argenio DA, Ichikawa JK, Bangera MG, Selgrade S, Burns JL, et al. Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. *Environmental Microbiology* 2003; 5: 1341-1349.
- Estivill X. Complexity in a monogenic disease. *Nature Genetics* 1996; 12: 348-350.

Ezekowitz AB, Day LE, Herman GA. A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med* 1988; 167: 1034-46.

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

Farber S. Some organic digestive disturbance in early life. *J Micr State Med Soc* 1945; 44 :587-94.

Frakking FNJ, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 145: 5-12.

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

Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, et al. Transforming growth factor β gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* 1986; 12: 281-288.

Gabolde M, Bataille MG, Feingold J, Besmond C. Association of variants alleles of mannose binding lectin severity of pulmonary disease in cystic fibrosis : cohort study. *BMJ* 1999; 319: 1166-67.

Garred P, Thiel S, Madsen HO, Ryder LP, Jensenius JC, Svejgaard A. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol* 1992; 90 : 517.

Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections : an other case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 1994; 21: 125-31.

Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *The Lancet* 1997; 349: 236-40.

Garred P, Pessler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hiby 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.

Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immunol* 2003; 40: 73-84.

Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen MO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006; 7: 85-94.

Ghiran I, Barbashov SF, Klickstein LB, Tas SW, Jensenius JC, Nicholson-Weller A. Complement receptor -1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *J Exp Med* 2000; 192(12): 1797-807.

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

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Spector , Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93-7.

Grande JP. Role of transforming growth factor- β in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 27-40.

Guardia A, Lozano F. Mannose-binding lectin deficiencies in infectious and inflammatory disorders. *Rev Med Microbiol* 2003; 14: 41-52.

Hajela K, Kojima M, Ambrus G, Nick Wrong KH, Moffatt BE, Ferluga J, et al. The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiol* 2002; 205: 467-75.

Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141:1567.

Hetherington CJ, Kingsley PD, Crocicchio F, Zhang P, Rabin MS, Palis J, et al. Characterization of human endotoxin lipopolysaccharide receptor CD14 expression in transgenic mice. *J Immunol* 1999; 162: 503.

Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. Collectins: Collagenous C-type lectins of innate immune defense system. *Immunol Today* 1994; 15: 67-74.

Hull J, Thomson A H. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 1018-1021.

Ichikawa JK, Norris A, Bangera MG, Geiss GK, Wout ABV, Bumgarner RE. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: Identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Microbiology* 2000; 17: 9659-9664.

Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337-45.

Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for a complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180: 86-99.

Jack DL e Turner MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 753-7.

Jagirdar J, Lee TC, Reibman J, et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta isoforms in asbestos-related diseases. *Environ Health Perspect* 1997; 5: 1197-1203.

Janeway JC, Traves P, Walport M, Shlomchi K. *Immunobiology: the immune system in healthy and disease*. 6 th Ed. New York, Garland Science 2005; p.8.1-8.52.

Kawamoto M, Romberger D J, Nakamura Y, Adachi Y, Tate L, Ertl R F, et al. Modulation of fibroblast type I collagen and fibronectin production by bovine bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 425-33, 1995.

Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; 137: 3855-3860.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan J, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald I, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.

Kerem E, Kerem, B. Genotype- phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 387-395.

Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, et al. TGF- β 1, but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 131-138.

Kilpatrick DC, McIntock LA, Allan EK, Copland M, Fujita T, Jordanides NE, et al. No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemoteraphy-related infections. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 279-84.

Klein NJ. Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol Immunol* 2005; 42: 919-924.

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

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

Koch C, Lanng S. Other organ systems. In: Hodson M, Gueddes D. *Cystic Fibrosis* 1995; London, Chapman & Hall Medical.

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

Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K, et al. Acute respiratory tract infections and mannose- binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285: 1316-1321.

Kohri K, Ueki IF, Nadel JA. Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L531-L540.

Kon Y, Tsukuda H, Hasegawa T. The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 25: 313-321.

Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin SO, Howard TD, Whittaker P.A, Meyers D.A, et al. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 965-9.

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

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399.

Landman R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, et al. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 1995; 171:639.

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

Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 21302-11.

Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non farmers' children. *Lancet* 2002; 360: 465-66.

LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, Karp CL, Halonen M, Martinez FD, et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *The Journal of Immunol* 2001; 167: 5838-5844.

Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, et al. High frequencies in African and non- African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 709.

Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene : frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 13.

Loubieres Y, Grenet D. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult Cystic fibrosis patients. *Chest* 2002; 121(1) : 73-80.

Lympny PA, Avila JJ, Mullighan C, et al. Rapid genotyping of transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms in a UK Caucasoid control population using the polymerase chain reaction and sequence – specific primers. *Tissue Antigens* 1998; 52: 573-8.

Madden SL, Wang CJ, Landes G. Serial Analysis of gene expression: from gene discovery to target identification . *Drug Discovery Today* 2000; 5(9):415-425.

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: 37.

Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm Lu, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155: 3013-20.

Magnan A, Frachon I, Rain B, et al. Transforming growth factor β in normal human lung: preferential location in bronchial epithelial cells. *Thorax* 1994; 49: 789-792.

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

Martin AC, Laing IA, Zhang G, Brennan S, Winfield K, Sly PD, et al. CD14 C-159T and early infection with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Respiratory Research* 2005; 6: 63.

Massaguè J, Hata A, Liu F. TGF β signalling through the Smad pathway. Trends Cell Biol 1997; 7 : 187-192.

Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1 s- like serine protease. J Exp Med 1992; 176: 1497-502.

McKone E F, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis : a retrospective cohort study. Lancet 2003; 361: 1671-6.

McMorran BJ, Palmer JS, Lunn DP, Oceandy D, Costelloe EO, Thomas GR, et al. G551D mice display an abnormal host response and have impaired clearance of *Pseudomonas* lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L740-L747.

Mead R, Jack D, Pembrey M, Tyfield L, Turner M. Mannose-binding lectin alleles in a prospectively recruited UK population. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. Lancet 1997; 349: 1669-70.

Merlo CA, Boyle MP. Modifiers genes in cystic fibrosis lung disease. J Lab Clin Med 2003; 141(4): 237-41.

Miller EM, Seals J, Kaye R, Levtsky LC. A familial, plasma associated defect of phagocytosis. The lancet 1968; 13: 60-7.

Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. Scand J Immunol 2002; 56: 630-41.

Morio H, Kurata H, Katsuyama R, Oka S, Kozutsumi Y, Kawasaki T. Renal expression of serum-type mannan-binding protein in rat. Eur J Biochem 1997; 243: 770-4.

Muhlebach MS, MacDonald SL, Button B, Hubbard JJ, Turner ML, Boucher RC, et al. Association between mannan-binding lectin and impaired lung function in cystic fibrosis may be age-dependent. Clin Exp Immunol 2006; 145: 302-07.

Mussi-Pinhata MM, Rego MA. Immunological peculiarities of extremely preterm infants: a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. J Pediatr 2005; 81: S59-S68.

Nakamura H, Yoshimura K, Mc Elvaney NG, Crystal RG. Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line. *J Clin Invest* 1992; 89: 1478-84.

Nakamura Y, Tate L, Ertl RF, Kawamoto M, Mio T, Adachi Y, et al. Bronchial epithelial cells regulate fibroblast proliferation. *Am J Physiol* 1995; 269: L377-87.

Newton RC, Summers C, Schwartz M, Graham A, Heptinstall LE, Super M, et al. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet* 1989; 1481-1483.

Olesen HV, Jensenius JC, Steffensen R, Thiel S, Schiotz PO. The mannan-binding lectin pathway and lung disease in cystic fibrosis –dysfunction of mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP-2) may be a major modifier. *Clin Immun* 2006; 121: 324-331.

Parizotto E A. Caracterização molecular de uma amostra de pacientes com Fibrose Cística do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, SP-Brasil, 1996.

Perrey C, Turner SJ, Pravica V, et al. ARMS-PCR methodologies to determinate IL-10, TNF- α , TNF- β e TGF- β 1 genes polymorphisms. *Transplant Immunol* 1999; 7: 127-8.

Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation : biology and disease association. *Mol Immunol* 2001; 38: 133-49.

Prodinger WM, Würzner R, Erdei A, Dierich MP. Complement in W and Paul. *Fundamental Immunology*, 4th Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 1998.

Prodinger WM, Würzner R, Stoiber H, Dierich MP. Complement. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*. 5th Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p. 1077-103.

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

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

Reid KBM. C1q and mannose- binding lectin. The human complement system in health and disease 1998; pp. 33-48.

Reis FJC e Damaceno N. Fibrose Cística. J Pediatr 1998; 74 (supl 1): S76-S94.

Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. Controvérsias na Fibrose Cística – do Pediatra ao Especialista. Jornal de Pediatria 2002; 78(2): S171-S186.

Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, et al. Expression of cystic fibrosis CFTR gene. Nature 1990; 347: 358-363.

Riordan, JR. Identification of the cystic fibrosis gene. Science 1989; 245: 1066-1073.

Rommens, JM. Identification of the cystic fibrosis gene II. Science 1989; 245:1059-1065.

Rook AH, Kehrl JH, Wakefield LM, et al. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytosolic activity and blunting of interferon responsiveness. J Immunol 1986; 136: 3916-20.

Saiffudin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of HIV type 1. J Gen Virol 2000; 81: 949-55.

Santis G, Osborne L, Knight R, Smith M, Davison T, Hodson M. Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1992; 14: 239.

Santos IK, Costa CH, Krieger H, Feitosa MF, Zurakowski D, Fardin B, et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infect Immun 2001; 69: 5212-5.

Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, Ohtani K, Suzuki Y, Watanabe Y, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. Scand J Gastroenterol 2000; 35 (9): 960-5.

Schafranski MD, Stier A, Nisihara R, Messias-Reason IJ. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease : a beneficial role for MBL deficiency. Clin Exp Immunol 2004; 138: 521-5.

Schwaebble W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. The mannan-binding lectin associated serine proteases (MASPs) and Map19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiol* 2002; 205 (4-5): 455-66.

Schwarz KB, Rosensweig S, Sharma L, Jones M, Durant C, Potter MR, et al. Plasma markers of platelet activation in cystic fibrosis liver and lung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 187-91.

Shirai Y, Kawata S, Ito N, Tamura S, Takaishi K, Kiso S, Tsushima H. Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta in patients with hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 676-79.

Shute J, Marshall L, Bodey K, Bush A. Growth factors in cystic fibrosis – when more is not enough. *Paediatric Resp Rev* 2003; 4: 120-7.

Shwachman H, Kulczycki LL. Long term study of 105 patients with cystic fibrosis : studies made over a five to fourteen year period. *Am J Dis Child* 1958; 96: 6-15.

Sime PJ, Marr RA, Gauldie D, et al. Transfer of tumor necrosis factor- α to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor – beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 1998; 153: 825-832.

Slieker MG, Sanders EAM, Rijkers GT, Ruven HJT. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2005; 4: 7-13.

Soborg C, Madsen HO, Andersen AB, Lillebaek T, KokJensen A, Garred P. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis* 2003; 188: 777-82.

Southern K W. $\Delta F508$ in cystic fibrosis : willing but not able. *Arch Dis Child* 1997; 76: 278-282.

Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor - β : recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992; 119 : 1017-1021.

Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Journal of Immunological Methods* 2000; 241: 33-42.

Stone PJ, Konstan MW, Berger M, Dorkin HL, Franzblau C, Snider GL. Elastin and collagen degradation products in urine of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:157-62.

Su GL, Dorko K, Strom SC, Nussler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol* 1999; 31: 435.

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; 337 (8757): 1569-70.

Summerfield JA, Taylor ME. Mannose-binding proteins in human serum : identification of mannose-specific immunoglobulins and a calcium-dependent lectin, of broader carbohydrate specificity, secreted by hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883: 197-206.

Summerfield JA, Ryder S, Sumiye M, Thurrsz M, Gorchein A, Monteil MA, et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345(8): 886-9.

Suthanthiran M, Li B, Song JO. Transforming growth factor - β 1 hyperexpression in African-American hypertensives : a novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3479-84.

Suter S, Schaad UB, Roux L, Nydegger UE, Waldvogel FA. Granulocyte neutral proteases and pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1984; 149: 523-531.

Suter S, Schaad UB, Morgenthaler JJ. - Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1988; 158: 89-100.

Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci* 1998; 96: 659-67.

Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 1997; 11: 51-59.

Tebbutt SJ, Lakerman MB, Wheeler JCW, Hill DF. Genetic variation within the ovine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Mutation Research Genomics* 1998; 382: 93-98.

Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Miyakawa H, Mafune N, Kikuta H. Relationship between gene polymorphisms of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2755-63.

The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *New Engl J Med* 1993; 329:1308-1313.

Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 31-5.

Tobin MJ. Pediatrics, Surfactante, and cystic fibrosis in AJRCCM 2002. *Am J Crit Care Med* 2003; 167: 333-344.

Tosi MF, Zakem H, Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 1990; 86: 300-308.

Tsui LC. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 47-53.

Turner MW. Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; 17(11): 532-40.

Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000; 2:305-22.

Uemura K, Saka M, Nakagawa T, Kawasaki N, Thiel S, Jensenius JC, et al. L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol* 2002; 169: 6945-50.

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J.J. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator : an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002; 1: 13-29.

Verdu P, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, et al. Evolutionary insight into the high worldwide prevalence of *Mbl2* deficiency alleles. Human Molecular Genetics 2006; 17: 2650-2658.

Wagner S, Lynch NJ, Walter W, Schwaeble WJ, Loos M. Differential expression of the murine mannose-binding lectins A and C in lymphoid and nonlymphoid organs and tissues. J Immunol 2003; 170: 1462-5.

Wallis R, Dodd RB. Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases. J Biol Chemistry 2000; 275(40) : 30962-9.

Wallis R, Structural and functional aspects of complement activation by mannose-binding protein. Immunobiol 2002; 205 (4-5) : 433-45.

Walport MJ. Complement. First of two parts. N Engl J Med 2001; 344:1058-66.

Walport MJ. Complement. Second of two parts. N Engl J Med 2001; 344:1140-4.

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

Wojnarowski C, Frischer T, Hofbauer E, Grabner C, Mosgoeller W, Eichler I, et al. Cytokine expression in bronchial biopsies of cystic fibrosis patients with and without acute exacerbation. Eur Respir J 1999; 14: 1136-1144.

Woodhead JL, FALLON R, FIGUERED H, LONGDALE J, MALCOM ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K. E. Human genetic diseases-a practical approach. Oxford, IRL Press Limited 1986; pp 51-64.

Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin : biology and clinical implications. Internal Medicine Journal 2005; 35: 548-55.

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

Wu L, Chau J, Young RP, Pokorný V, Mills GD, Hopkins R, et al. Transforming growth factor- β 1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2004; 59: 126-129.

Xu Y, Clark JC, Aronow BJ, Dey CR, Liu C, Wooldridge JL, Whitsett JA. Transcriptional Adaptation to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 7674-7682.

Yarden J, Radojkovic D, Boeck KD, Macek M, Zemkova JD, Vavrova V, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. *J Med Genet* 2004; 41: 629-33.

Yoon HJ, Shin JH, Yang SH, Chae DW, Kim H, Lee DS, et al. Association of the CD14 gene – 159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. *J Med Genet* 2003; 40: 104-108.

Zielenski J. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991; 10: 214-228.

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

8- ANEXOS

ANEXO 1

Os critérios que são utilizados para o diagnóstico da Fibrose Cística são :

- 1- Presença de dois alelos mutados no gene da FC
- 2- Duas dosagens de sódio e cloro com valores acima de 60mEq/L

- Ou os critérios clínicos da :

- 3- Presença de insuficiência pancreática
- 4- Presença de doença pulmonar crônica

ANEXO 2

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-7187

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

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 05/01/06.

(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 596/2005

CAAE: 1538.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES: MBL2, TGF- B1 E CD14 COM A GRAVIDADE DO QUADRO PULMONAR NA FIBROSE CÍSTICA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elisangela Jacinto de Faria

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/10/05

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/11/06

II - OBJETIVOS

Investigar a associação entre os polimorfismos dos genes: MBL2, TGF-B1 e CD14 com a gravidade do quadro pulmonar em pacientes com fibrose cística.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 80 pacientes com fibrose cística em acompanhamento no Ambulatório de Fibrose Cística da Unicamp. A gravidade do quadro será avaliada pelo escore de Shwachman. Será coletado sangue periférico para obtenção dos leucócitos para análise da MBL, TGF-b1, e CD14. Todas as técnicas estão bem descritas no projeto.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram adequados estando de acordo com as normas da Resolução 196/96 complementares.

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 XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2005.


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

ANEXO 3



Universidade Estadual de Campinas Departamento de Genética Médica

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: **Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: *MBL2*, *TGF- β 1* e *CD14* com a gravidade do quadro pulmonar na Fibrose Cística**

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com fibrose cística. O objetivo geral do estudo é analisar em uma amostra de pacientes fibrocísticos, a existência de genes modificadores, tais como, MBL, TGF-B1 e CD14, uma vez que esses genes poderiam estar contribuindo com a gravidade do quadro pulmonar. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 ml, o equivalente a quatro colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta alteração genética. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente

comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Em todos os indivíduos que forem detectadas alteração gênica, será oferecida toda a orientação genética. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 788-8909 (Profa.Dra.Carmen).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

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

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

Nome e Rg do participante

Assinatura do participante

Data

Nome e Rg dos pais ou responsável legal

Assinatura dos pais ou responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

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

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DA AMOSTRA ARMAZENADA

Eu concordo que o meu DNA seja utilizado em pesquisas futuras, sem necessidade de nova autorização, desde que o projeto seja aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP. Esse material será armazenado no Banco de DNA do laboratório de Genética Molecular, cujo regimento foi aprovado pelo CEP/FCM.

Eu não concordo que o meu DNA seja utilizado em pesquisas futuras, sem necessidade de nova autorização, desde que o projeto seja aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP

Assinatura do sujeito da pesquisa

Data

ANEXO 4

Quadro - Relação dos primers utilizados para identificação dos polimorfismos no éxon 1 (códon 52, 54 e 57) e região promotora (alelos H/L e X/Y) no gene *MBL2*.

Specificity (nt pos)	Mix	Primer id	Sequence
Exon 1 Codon 52 (+223) D	D	sspMBPla 52 D	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACA-3'
Exon 1 Codon 52 (+223) non D	ABC	sspMBPla 52 ABC	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG3' 5'-TCTCCCTTGGTGCCATCACG-3'
Exon 1 Codon 54 (+230) B	B	sspMBPla 54 B	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-CCCCCTTTTCTCCCTTGGTG-3'
Exon 1 Codon 54 (+230) non B	ACD	sspMBPla 54 ACD	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-CCCCCTTTTCTCCCTTGGTG-3'
Exon 1 Codon 57 (+239) C	C	sspMBPla 57 C	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-ACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCT-3'
Exon 1 Codon 57 (+239) non C	ABD	sspMBPla 57 ABD	5'-CTGCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3' 5'-ACGTACCTGGTTCCCCCTTTTCT-3'
Exon 1 control	control	HGH-1s HGH-2as	5'-TGCCTTCCCAACCATTCCTTA-3' 5'-CCACTCACGGATTCTGTGTGTTTC-3'
Promoter H (-550)	H	H-s H/L-as	5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3' 5'-AACAAATGGGACCGTGCATTGC-3'
Promoter L (-550)	L	L-s H/L-as	5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3' 5'-AACAAATGGGACCGTGCATTGC-3'
Promoter Y (-221)	Y	Seq-s Y-as	5'-CCTGCCAGAAAGTAGAGAGG-3' 5'-CTGGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'
Promoter X (-221)	X	Seq-s X-as	5'-CCTGCCAGAAAGTAGAGAGG-3' 5'-GGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'
Promoter/ 5'UT	Control	C5 C3	5' TGCCAAGTGGAGCACCCA-3' 5' GCATCTTGCTCTGTGCAGAT- 3'

ANEXO 5

ESCORE DE SHWACHMAN

Pontos	ATIVIDADE GERAL
25	- Atividade plena, resistência e tolerância ao exercício normal, boa disposição, desenvolvimento motor normal, frequência escolar normal.
20	- Leve limitação à atividade intensa, cansa ao final do dia ou após exercício prolongado, menos energético, limite inferior do desenvolvimento motor normal, ocasionalmente irritado. ou apático, boa frequência escolar.
15	- Descansa voluntariamente, cansa após exercício, frequência escolar regular, moderadamente inativo, leve retardo motor, falta espontaneidade, passivo ou irritável.
10	- Atividade física e tolerância ao exercício limitada, dispnéico após exercícios, retardo motor moderado, agitado ou irritado, preguiçoso, abatido, frequência escolar baixa, pode requerer professor particular.
5	- Limitação grave da atividade, dispnéia e ortopnéia, inativo ou confinado a cama ou cadeira, marcado retardo motor, apático ou irritado, não pode assistir as aulas.

Pontos	EXAME FÍSICO
25	- Sem tosse, frequência cardíaca e frequência respiratória normais, sem evidências de enfisema, pulmões limpos à ausculta, boa postura, sem baqueteamento.
20	- Tosse seca ocasional, frequência cardíaca e frequência respiratória normais no repouso, enfisema leve, murmúrio vesicular rude, roncos e tempo expiratório prolongado ocasionais, boa postura e baqueteamento leve.
15	- Tosse leve e crônica matinal após exercício/ choro e ocasionalmente durante o dia, sem tosse noturna, frequência cardíaca e frequência respiratória levemente aumentadas, aumento de diâmetro antero-posterior e diafragma rebaixado, murmúrio vesicular rude, estertores crepitantes, roncos ou sibilos, baqueteamento $\frac{1}{2}$.
10	- Tosse crônica, freqüente, repetitiva, produtiva, raramente paroxística, aumento moderado da frequência cardíaca e frequência respiratória, enfisema moderado a grave, freqüentemente com deformidade torácica, estertores crepitantes, roncos e sibilos usualmente presentes, freqüentemente disseminados, baqueteamento $\frac{2}{3}$.
5	- Tosse intensa, paroxística, freqüentemente produtiva, com vômitos e hemoptise, tosse noturna, taquipnéia e taquicardia, enfisema grave, estertores crepitantes, roncos e sibilos generalizados, expiração audível, má postura, $\frac{3}{4}$ de baqueteamento, cianose freqüente.

Pontos	NUTRIÇÃO
25	- Peso e altura acima do percentil 25 ou compatível com padrão familiar, tônus e massa muscular normais, gordura subcutânea normal, maturação sexual normal, fezes quase normais, bom apetite.
20	- Peso e altura acima do percentil 10 ou levemente abaixo do padrão familiar, tônus e massa muscular bons, tecido subcutâneo levemente diminuído, maturação sexual levemente retardada, apetite normal, fezes levemente alteradas com maior frequência.
15	- Peso e altura acima do percentil três ou moderadamente abaixo do padrão familiar, peso usualmente deficiente para altura, tônus e massa muscular regulares, gordura subcutânea deficiente, abdome levemente distendido, maturação sexual retardada, fezes volumosas, formadas, com mau cheiro e flutuantes.
10	- Peso e altura abaixo do percentil três, tônus e massa muscular pobres, deficiência marcada de gordura subcutânea, distensão abdominal moderada, maturação sexual insuficiente, sem estirão, mau apetite, fezes pouco formadas, volumosas, com mau cheiro e gordurosas.
5	- Mal nutrido e baixo, músculos fracos, flácidos e pequenos, sem gordura subcutânea, perda de peso freqüente, fezes freqüentemente volumosas, com mau cheiro e gordurosas, prolapso retal freqüente.

Pontos	ACHADOS RADIOLÓGICOS
25	- Sem evidências de enfisema, sem aumento da trama broncovascular, sem opacidades ou atelectasias.
20	- Evidência mínima de enfisema, leve aumento da trama broncovascular, sem opacidades ou atelectasias.
15	- Enfisema moderado, diâmetro antero-posterior aumentado, campos pulmonares mais radiolucentes, diafragma moderadamente rebaixado, trama broncovascular aumentada, atelectasias localizadas ou irregulares, opacidade ocasional transitória.
10	- Enfisema marcado, diâmetro antero-posterior marcado, marcada rebaixamento do diafragma, silhueta cardíaca estreita, áreas de atelectasias disseminadas, atelectasias segmentares ou lobares ocasionais, focos persistentes de opacidades, cistos localizados, aumento marcado da trama.
5	- Alterações extensivas, hiperinsuflação grave, opacidades e atelectasias disseminadas, formação disseminada de cistos, formação de bronquiectasias e abscessos, atelectasias lobares persistentes.