



Aline Roberta Bariani Marcelino

**Polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene *COX2* e
57460C>T no gene *IFRD1* como modificadores da
gravidade da fibrose cística**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Aline Roberta Bariani Marcelino

**Polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene *COX2* e
57460C>T no gene *IFRD1* como modificadores da
gravidade da fibrose cística**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestra em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE ROBERTA BARIANI
MARCELINO E ORIENTADO PELA PROF^ª. DR. CARMEN SILVIA
BERTUZZO.

Assinatura do Orientador

Campinas

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M331p Marcelino, Aline Roberta Bariani, 1985-
Polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene COX2 e
57460C>T no gene IFRD1 como modificadores da
gravidade da fibrose cística / Aline Roberta Bariani
Marcelino. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Fibrose cística. 2. Polimorfismo (Genética). 3.
Fenótipo. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia, 1963-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: -765G>C and 8473T>C COX2 polymorphisms and 57460C>T IFRD1 polymorphism as cystic fibrosis modifiers.

Palavras-chave em inglês:

Cystic fibrosis

Polymorphism, Genetic

Phenotype

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carmen Sílvia Bertuzzo [Orientador]

Monica Barbosa de Melo

Ana Lucia Brunialti Godard

Data da defesa: 20-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ALINE ROBERTA BARIANI MARCELINO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



2. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO



3. PROF(A). DR(A). ANA LUCIA BRUNIALTI GODARD



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

Data: 20/03/2013

Dedicatória

Aos meus pais.

Agradecimentos

Agradeço a minha amada mãe Denise, que sempre me ouve e me dá força com abraços, conselhos ou apenas um pedaço de chocolate tornando tudo mais doce e simples.

Ao meu pai Ailton que com sua calma inata me trouxe tranquilidade durante nossas intermináveis conversas. Ele que sempre acreditou em mim e incentivou a ser tudo o que eu sou hoje.

Ao Felipe, meu namorado e meu amigo. Todo amor que ele entrega a mim torna minha vida mais completa e mais fácil.

Ao meu querido irmão Eduardo “Mano Brown” que aos fins de semana quando ele abandona São Paulo e volta à grandiosa Valinhos enche meus dias de música, risadas e alegria.

A minha amiga, companheira e professora Luciana “Mush” Bonadia que em aulas sobre o envoltório nuclear, conversas via SMS e conversas formais tornou meus últimos anos muito mais felizes e sábios.

Ao Fernando Marson que sempre me acalma e nunca recusa um cafezinho. Além de amigo, um pesquisador essencial e de importância única nessa caminhada.

À Luciana Montes Rezende que foi grande contribuidora na reta final deste projeto.

À aqueles que repartiram bancadas, risadas e conselhos ao longo de vários fins de semana em que éramos os poucos habitantes da FCM: Alê e Si, vocês tornaram esses dias muito mais prazerosos!

À aqueles que de alguma forma e em algum momento tornaram a convivência no laboratório uma grande alegria: Renato “Zé” Santos, Milena Simioni, Marina Gonsales, Ilária Sgardioli, Daniela Furgeri e Daniela Souza.

À Daniele “Dida” Correa e à Marjory “Jojoy” Marcello com quem tenho compartilhado alegrias, aventuras, risadas e conhecimento desde 2004.

Agradeço aos meus colegas de profissão: Roberta, Mara e Sula.

À professora Carmen Bertuzzo que desde 2005 me ensinou a continuar e tentar alternativas mesmo quando tudo parecia não funcionar. Foi além de minha orientadora, uma pessoa na qual eu sempre soube que poderia confiar.

Aos pacientes e suas famílias que permitiram a realização deste estudo.

Agradeço especialmente aos meus alunos, que me ensinaram uma nova e feliz forma de viver.

"É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.

Dizem que são tão belas!"

Antoine De Saint-Exupéry

A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) que acarretam em defeito ou na ausência da proteína por ele sintetizada. A CFTR, produto deste gene é uma proteína canal, localizada na membrana apical das células, responsável pela condução de íons cloreto. As mutações levam à ausência da proteína CFTR ou a alteração qualitativa/quantitativa da proteína, que acarreta no desequilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular. Como consequência há a ocorrência de muco viscoso e de difícil excreção nos pulmões e obstrução dos ductos pancreáticos, afetando desta forma o sistema respiratório e digestório. São conhecidas mais de 1.900 mutações no gene *CFTR*, sendo que mesmo em pacientes com mutações iguais como a F508del – com alta prevalência na população brasileira – há divergência entre os fenótipos observados. Dessa forma, o genótipo *CFTR* parece não ser determinante na modulação da gravidade clínica, uma vez que, indivíduos com mesmo genótipo *CFTR* apresentam manifestações clínicas diferentes. Outros genes, diferentes do *CFTR* foram associados à gravidade clínica dos pacientes, revelando que os produtos por eles expressos exercem algum tipo de ação modificadora do fenótipo da FC. Tais genes foram denominados modificadores e atuam em fatores secundários relacionados à evolução do quadro clínico, como a articulação do sistema imune. Os genes *COX2* e *IFRD1*, com ação importante no sistema imune e no recrutamento de células de defesa foram identificados como modificadores da FC em estudos prévios realizados em uma população diferente da brasileira. No presente estudo, os polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene *COX2* e 57460C>T no gene *IFRD1*, candidatos a modificadores, foram identificados nos pacientes e um estudo de associação genótipo-fenótipo foi conduzido a fim de verificar a ação moduladora de tais polimorfismos nos pacientes

estudados. Nenhuma associação foi encontrada, exceto para o íleo meconial ($p=0,028$ – em pacientes com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes à classe I, II e III) e para a polipose nasal ($p=0,022$ – em pacientes sem considerar o genótipo *CFTR*) para o polimorfismo 8473T>C no gene *COX2*.

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) gene mutations that lead to defective polypeptide or lack of the protein CFTR. The CFTR is a channel protein located in the apical cells membrane, responsible for chloride ions conductance. The mutations lead to an osmotic disequilibrium between intra and extracellular mediums, which causes viscous mucus production that is hard to be eliminated from lungs and pancreatic ducts, affecting, this way, respiratory and digestive systems. More than 1,900 *CFTR* different mutations are known, and even patients that carries identical mutations as F508del – the most common one in Brazilian population – shows a great discrepancy between the phenotypes that are observed. Thus, *CFTR* genotype seems not to be crucial in disease clinical course modulation, once different subjects carrying the same *CFTR* mutations reveal distinctive clinical manifestations. Genes besides *CFTR* were associated to CF patients clinical manifestation, revealing that the molecules they express have some kind of modifier activity in CF phenotype. Such genes were labeled as modifier genes and they act in secondary factors related to clinical course evolution as immune system response. The genes *COX2* and *IFRD1* have an important role in immune system and defense cell recruitment and they were identified as CF modifiers in previous studies that analyzed different population from the Brazilian one. In this current study, the polymorphisms -765G>C, 8473T>C and 57460C>T located in these genes were identified in our patients and association genotype-phenotype were carried out in order to verify the modulator activity of such variants in the studied casuistic. There was not found association, except for meconium ileus ($p=0,028$ – in patients with two *CFTR* mutations from class I, II and III) and for nasal polyposis ($p=0,022$ – in patients whose *CFTR* genotype was not considered) to 8473T>C polymorphism in *COX2* gene.

Lista de abreviaturas

ATP: Adenosina trifosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

COX: *Ciclooxygenase*

DNA: *Deoxyribose Nucleic Acid* – Ácido desoxirribonucleico

ENaC: *Epithelial Na⁺ Channel* – Canal epitelial de sódio

FC: Fibrose Cística

HC: Hospital de Clínicas

IFRD1: *Interferon-Related Developmental Regulator 1*

IL-6: Interleucina 6

Kb: quilobases

MSD1 e MSD2: *Membrane-Spanning Domains*

NBD1 e NBD2: *Nucleotide-Binding Domains*

Pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da polimerase

PGD2: Prostaglandina D2

PKA: proteína quinase A

PTGS2: *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*

RNA: *Ribose Nucleic Acid* – Ácido Ribonucleico

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de base única

Sp1 e Sp3: *Specificity Protein 1*

TNF: Tumor Necrosis Factor – Fator de Necrose Tumoral

UTR: *Untranslated region* – Região não traduzida

Figura 1. Cromossomo humano 7 e a localização do gene <i>CFTR</i>	19
Figura 2. Organização do gene <i>CFTR</i>	20
Figura 3. Estrutura da proteína CFTR.....	21
Figura 4. Classes de mutações no gene <i>CFTR</i>	23
Figura 5. CFTR na glândula sudorípara.....	25
Figura 6. CFTR no epitélio pulmonar.....	26
Figura 7. Posição do gene <i>COX2</i> no cromossomo 1.....	34
Figura 8. Estrutura do gene <i>COX2</i>	34
Figura 9. Região promotora 5' UTR do gene <i>COX2</i>	35
Figura 10. Posição do gene <i>IFRD1</i> no cromossomo 7.....	39
Figura 11. Estrutura do gene <i>IFRD1</i>	39
Figura 12. Eletroforese de PCR para detecção do polimorfismo -765G>T no gene <i>COX2</i>	52
Figura 13. Eletroforese de PCR para detecção do polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>	52
Figura 14. Eletroforese de PCR para detecção do polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>	53
Figura 15. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>	55
Figura 16. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo 84673T>C no gene <i>COX2</i>	56

Figura 17. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo 54760C>T no gene <i>IFRD1</i>	56
---	----

Lista de tabelas

Tabela 1. Condições das PCRs conduzidas para os três polimorfismos estudados.....	51
Tabela 2. Características dos <i>primers</i> (oligonucleotídeos) e fragmentos amplificados.....	51
Tabela 3. Enzimas utilizadas para cada reação de digestão enzimática de acordo com o polimorfismo.....	54
Tabela 4. Protocolo da reação de digestão enzimática.....	54
Tabela 5. Descrição dos fragmentos resultantes após realização da técnica de digestão enzimática de acordo com o genótipo apresentado pelo paciente.....	55
Tabela 6. Frequência alélica, frequência genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos 103 pacientes com fibrose cística com relação aos polimorfismos estudados.....	60
Tabela 7. Sexo, raça e idade dos 103 pacientes com fibrose cística em relação aos polimorfismos estudados.....	61
Tabela 8. Associação dos polimorfismos estudados com idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares em pacientes com fibrose cística.....	63
Tabela 9. Associação dos polimorfismos estudados com IMC, presença de polipose nasal, presença de diabetes, osteoporose, insuficiência pancreática e íleo meconial em pacientes com fibrose cística.....	64

Tabela 10. Associação dos polimorfismos estudados com a presença das bactérias <i>P. aeruginosa</i> mucoide e não mucoide e <i>S. aureus</i> em pacientes com fibrose cística.....	65
Tabela 11. Sexo, raça e idade dos pacientes com fibrose cística com as duas mutações identificadas no gene <i>CFTR</i> com relação aos polimorfismos estudados.....	67
Tabela 12. Associação dos polimorfismos estudados com idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares em pacientes com fibrose cística com as duas mutações <i>CFTR</i> identificadas.....	68
Tabela 13. Associação dos polimorfismos estudados com IMC, presença de polipose nasal, presença de diabetes, osteoporose, insuficiência pancreática e íleo meconial em pacientes com fibrose cística com as duas mutações <i>CFTR</i> identificadas.....	69
Tabela 14. Associação dos polimorfismos estudados com a presença das bactérias <i>P. aeruginosa</i> mucoide e não mucoide e <i>S. aureus</i> em pacientes com fibrose cística com as duas mutações <i>CFTR</i> identificadas.	70
Tabela 15. Associação do polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i> com a saturação de O ₂ , os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos no exame de espirometria.....	71
Tabela 16. Associação do polimorfismo 8473C>T no gene <i>COX2</i> com a saturação de O ₂ , os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos no exame de espirometria.....	72
Tabela 17. Associação do polimorfismo 54760C>T no gene <i>IFRD1</i> com a saturação de O ₂ , os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos no exame de espirometria.....	73
Tabela 18. Resumo dos dados clínicos da casuística.....	74

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de tabelas	xv
Sumário	xvii
I - Introdução	18
Caracterização da doença	19
Incidência da FC	28
Genes modificadores	29
Gene <i>COX2</i>	32
Polimorfismo -765 G>C	36
Polimorfismo 8473T>C	37
Gene <i>IFRD1</i>	38
II - Objetivo	42
III – Casuística e métodos	44
Métodos	46
Coleta do material.....	46
Coleta de dados clínicos	46
Amplificação gênica	50
Digestão enzimática.....	53
Análise estatística	56
IV - Resultados.....	58
V - Discussão	75
VI - Conclusões	86
VII – Referências Bibliográficas.....	88
VIII – Anexos.....	96

I - Introdução

Caracterização da doença

A Fibrose Cística (FC), também conhecida como mucoviscidose ou doença do suor salgado é uma doença monogênica autossômica recessiva causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*). Desta forma, apenas indivíduos com duas mutações no *CFTR* manifestam a doença. O gene *CFTR* está localizado na região 7q31.1 (1), com 250 Kb e composto por 27 exons que codificam um RNA mensageiro de 6,5 Kb (2) (Figura 1).

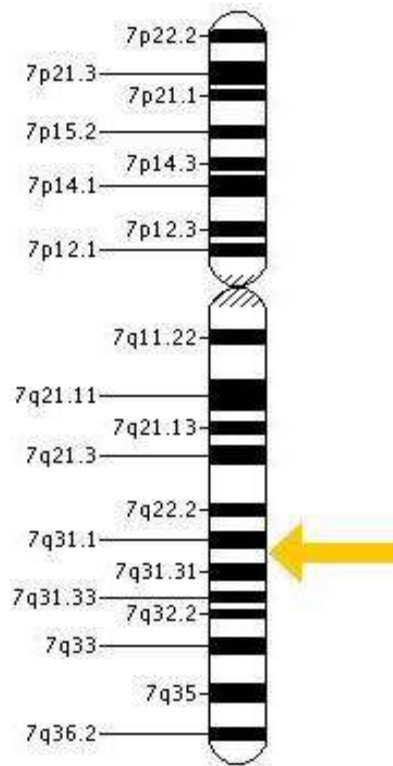


Figura 1. Cromossomo humano 7. A seta indica a posição do gene *CFTR* no cromossomo.

A proteína codificada pelo gene *CFTR* pertence à família das proteínas ATP reguladoras de transporte de íons, denominada Proteína Transmembrana Reguladora da Condutância Iônica, cuja sigla é CFTR - *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* - e apresenta 1480 aminoácidos (3). Devido à sua estrutura, constituição e o modo como está inserida na membrana plasmática, a CFTR tem a estrutura de um canal que permite a comunicação e transporte iônico entre os meios intra e extracelular (Figura 2).

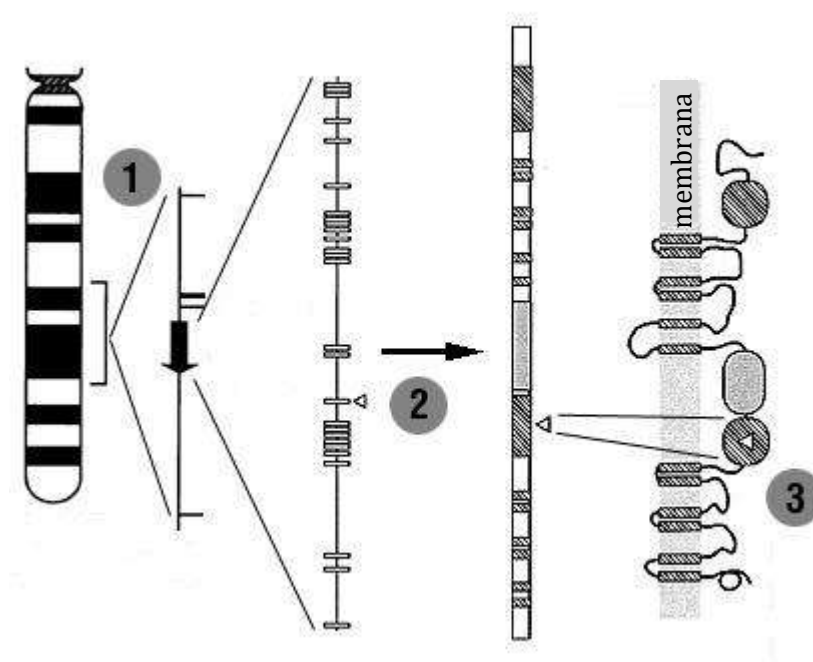


Figura 2. Organização do gene *CFTR*. Em 1 é apresentada a região cromossômica na qual o gene está localizado. Em 2 são apresentados os exons e introns constituintes do gene. Os retângulos ao longo da linha, na figura 2, representam as regiões codificantes (exons). Em 3 pode-se visualizar a proteína já sintetizada e ancorada na membrana plasmática. Fonte: <http://www.lifesciencesfoundation.org/>.

A CFTR constitui um canal de cloro que se ancora na membrana apical de células epiteliais das vias aeríferas, pâncreas, intestino e no aparelho reprodutor. A conformação da proteína faz com que o poro por ela delimitado mantenha-se fechado, impedindo o transporte iônico entre os meios intra e extracelular. Em sua estrutura podem ser distinguidos dois domínios transmembrana (MSD1 e MSD2), dois domínios com sítio de ligação para o ATP (NBD1 e NBD2), e um domínio regulatório (R) que promove o controle de abertura e fechamento do canal formado pelo polipeptídeo (Figura 3). A porção R sofre fosforilação pela proteína quinase A (PKA), fazendo com que, desta forma, a secreção de íons seja dependente de AMPc (1). Quando a CFTR é fosforilada pela PKA, ocorre a abertura a qual permite a secreção controlada de íons cloreto no fluido extracelular (4).

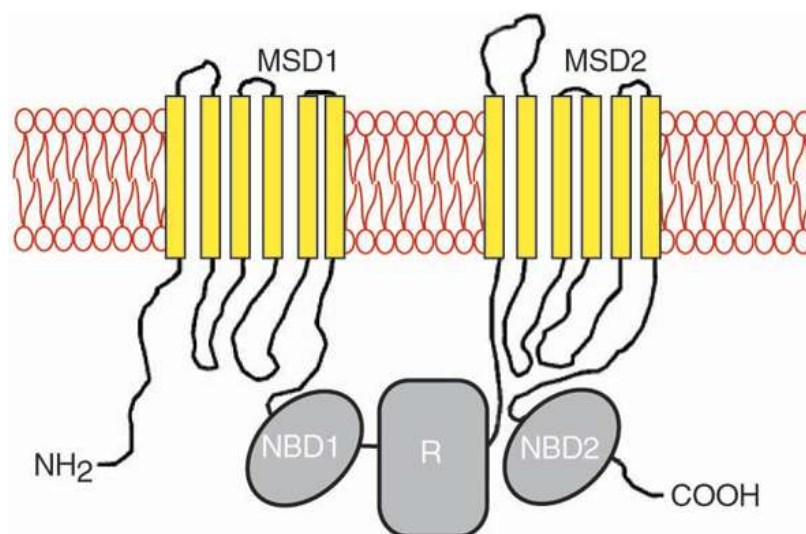


Figura 3. Estrutura da proteína CFTR demonstrando o canal formado pela ancoragem da proteína CFTR na membrana apical das células. Na porção intracelular estão presentes os sítios (NBD1 e NBD2) nos quais ocorre a fosforilação do ATP (*ATP binding site*) e o domínio regulatório (R) com função de controlar a abertura do canal. Fonte: <http://www.genet.sickkids.on.ca>.

Desta forma, a presença de mutações em ambas as cópias do gene *CFTR* influencia a estrutura e funcionamento deste canal, bem como, sua presença ou ausência nas células; como consequência há diminuição da condução de íons cloreto (Cl^-) pela membrana apical, levando a distúrbios fisiológicos nos órgãos afetados, o que caracteriza o quadro clínico complexo dos pacientes com FC.

São descritas mais de 1.900 mutações (5) no gene *CFTR*. Devido a esse elevado número e a fim de facilitar o estudo e entendimento dos processos fisiológicos da doença, as mutações foram divididas em seis classes distintas, dependendo do tipo de evento mutacional ocorrido e a consequência deste na célula afetada e proteína (6, 7) (Figura 4). As mutações que provocam um sinal prematuro para o término da síntese proteica, resultando em nenhuma proteína final são denominadas mutações de classe I. Mutações da classe II são caracterizadas pelo processamento e maturação proteica defeituosos, resultando em uma molécula proteica CFTR anormal que não é ancorada à membrana celular; a esta classe pertence à mutação F508del que é a mais frequente nos pacientes com FC. A classe III é caracterizada por mutações que levam à produção de proteínas que embora sejam ancoradas corretamente à membrana, são defeituosas quanto à regulação iônica, sendo que o domínio regulatório é afetado. As classes I, II e III abrangem as mutações mais graves, já que não há praticamente nenhum funcionamento do canal de cloreto, uma vez que, a proteína CFTR está ausente ou com o domínio regulador defeituoso. Na classe IV estão presentes as mutações que reduzem a condução iônica pelo poro. Mutações de classe V levam à diminuição da produção normal da CFTR, afetando, portanto, a quantidade de canais ancorados à membrana, reduzindo o transporte de íons consequentemente. Por fim, a classe VI compreende mutações cujas proteínas são

ancoradas à membrana, entretanto apresentam tempo de ancoragem reduzido, o que também reduz o transporte de íons pela membrana apical (8).

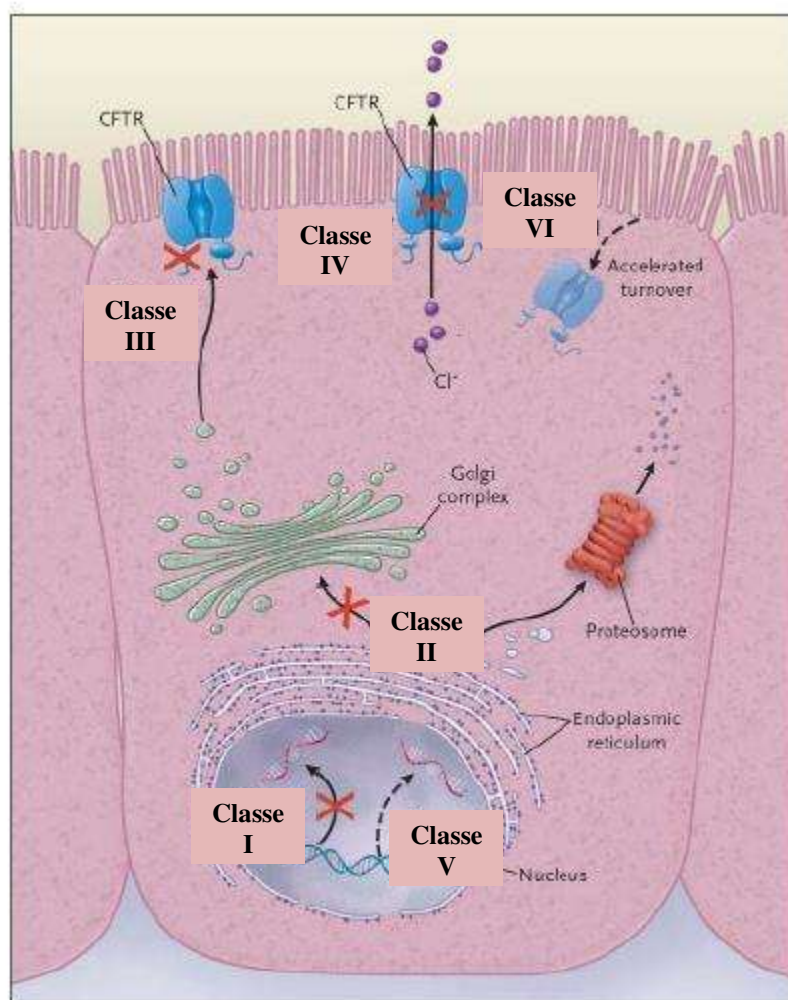


Figura 4. No esquema de uma célula epitelial são representadas as classes de mutações no gene *CFTR*. Mutações de classes I e II acarretam na não formação da proteína CFTR. Proteínas decorrentes das mutações de classe III apresentam problemas na regulação do funcionamento. As pertencentes à classe IV diminuem a quantidade de íons que atravessam o canal, as pertencentes à classe V apresentam menor quantidade de CFTR traduzida e proteínas CFTR de classe VI apresentam tempo de ancoragem reduzido.

A mutação mais frequente ocorre no exon 10 do gene *CFTR* e trata-se de uma deleção de três pares de bases denominada F508del que leva à perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína resultante. Na população da região de Campinas esta mutação contribui para cerca de 40 a 50% dos casos de FC (9, 10).

As consequências da perda de função da proteína variam de acordo com os tecidos envolvidos. A proteína defeituosa causa transporte anormal dos íons cloreto pela membrana apical das células epiteliais das vias aeríferas, pâncreas, intestino e aparelho reprodutor.

Nas glândulas sudoríparas, ocorre falha na reabsorção dos íons cloro enquanto o suor se move pelo ducto, o que ocasiona o acúmulo deste íon no suor (Figura 5). Além disso, ocorre a hiperatividade de um canal de sódio (ENaC) cujo funcionamento é dependente da CFTR, o que leva à secreção de sódio para o meio extracelular (11). Consequentemente, uma das manifestações clássicas da doença são os teores, tanto de sódio como de cloro, alterados no suor dos pacientes. Tal sintoma explica o nome de “doença do suor salgado” que a FC também recebe. A forma mais simples de diagnosticar esta doença é constatar a concentração destes íons em excesso no suor pelo “Teste de sódio e cloro” no qual são determinadas as concentrações dos íons sódio e cloreto no suor dos pacientes (12).

Já no pulmão e no pâncreas, outros órgãos afetados pela doença, a CFTR quando ausente ou deficiente em seu funcionamento, não realiza a secreção de cloro, levando à hiperatividade de um canal de sódio (ENaC), que aumenta a absorção deste íon. Em decorrência, há a entrada de água no meio intracelular devido à diferença de pressão osmótica (Figura 6). Desta forma o meio extracelular, após perder água por osmose, se torna mais concentrado, tornando o muco extracelular mais espesso, acometendo o sistema respiratório, digestório e reprodutor (13, 14). Uma forma alternativa para o diagnóstico da FC é a medição da diferença de potencial na mucosa nasal e intestinal que permite a

constatação do defeito básico da FC nos dois sistemas mais afetados: respiratório e digestório (15).

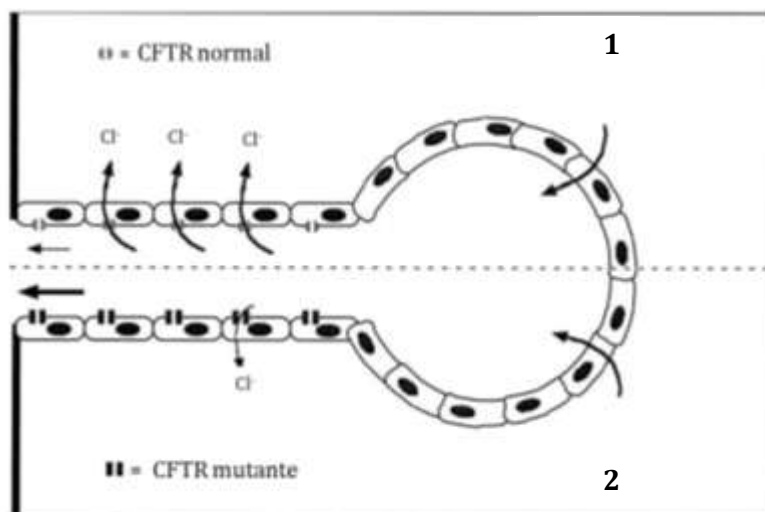


Figura 5. Papel da CFTR nas glândulas sudoríparas. Em 1 pode-se observar o ducto sudoríparo de um indivíduo normal, no qual ocorre reabsorção de cloreto, fazendo com que a quantidade deste íon seja pequena na secreção eliminada. Em 2 pode-se observar o ducto pancreático de um indivíduo com FC. Devido à presença da CFTR mutante, a reabsorção de cloreto é ineficiente, o que acarreta no acúmulo deste íon no suor. Fonte: <http://cmr.asm.org/content/15/2/194/F1.expansion.html> acesso em 02/03/13.

No sistema digestório o muco pode obstruir o pâncreas evitando que as enzimas pancreáticas alcancem o intestino, o que afeta de 85 a 90% dos pacientes com FC, dependendo do tipo de mutações que o indivíduo apresenta. Os pacientes que não desenvolvem insuficiência pancreática têm melhor prognóstico, pois conseguem manter melhor estado nutricional. Entretanto, a insuficiência pancreática pode ser controlada pela reposição enzimática e a ingestão de suplementos nutricionais, que contribuem para melhorar a qualidade de vida. No recém-nascido pode ocorrer íleo meconial, uma

solidificação composta pelo mecônio e pelo muco que se forma no íleo distal. Esta é a manifestação mais precoce da FC, presente em 15 a 20% dos recém-nascidos com a doença (16, 17).

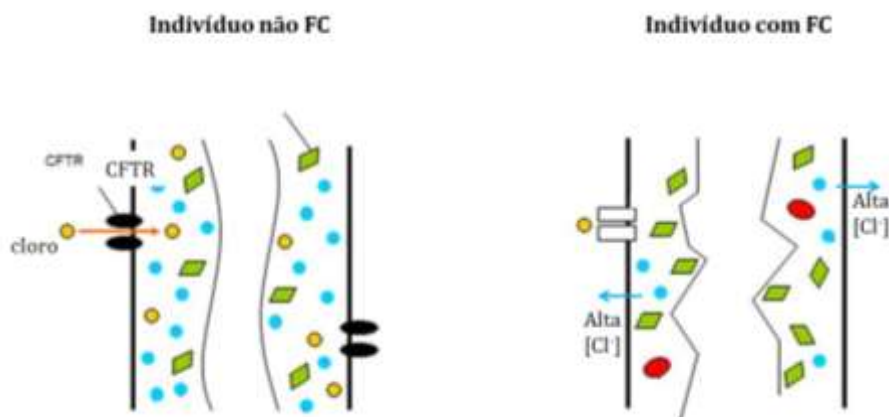


Figura 6. Ação da CFTR no epitélio pulmonar. Em indivíduos não FC, a CFTR posicionada na membrana apical é responsável por secretar íons cloreto para o meio extracelular, fazendo com que por osmose, grande quantidade de água se desloque para este meio, caracterizando o muco com características saudáveis. Em pacientes com FC, o defeito na CFTR impede a secreção de cloreto para o meio extracelular, fazendo com que o meio intracelular se torne hipertônico. Como consequência, a água do meio extracelular se desloca para o meio hipertônico, tornando o muco viscoso, manifestação clínica mais frequente nos pacientes com FC. Fonte: <http://www.nchpeg.org/> acesso em 02/03/13.

Quanto ao sistema respiratório, noventa e cinco por cento dos indivíduos são afetados e as manifestações apresentam-se de forma progressiva e com intensidade variável (16). A doença pulmonar apresentada pela maioria dos pacientes está relacionada à desidratação do muco que ocorre devido ao transporte iônico defeituoso (18). A hidratação das vias aeríferas é essencial para um muco fluído e saudável, já que este representa a

principal barreira entre o epitélio das vias aeríferas e o meio ambiente, constituindo o primeiro mecanismo de defesa nas vias respiratórias; além disso, o muco hidratado é fundamental para o batimento ciliar adequado (19). O muco de pacientes com FC tem características adesivas e muito viscosas, tornando-o especialmente difícil de ser “limpo” o que pode ter efeitos na infecção por bactérias, que encontram no muco o ambiente adequado para o estabelecimento e formação de suas colônias (20). A infecção bacteriana na maioria das vezes é adquirida na infância e mantida até a vida adulta, sendo que normalmente é restrita às vias respiratórias e persiste mesmo depois de antibioticoterapia intensiva. Nos primeiros anos de vida e infância, a infecção das vias aeríferas é geralmente causada pelas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*; posteriormente, a infecção crônica é dada por *Pseudomonas aeruginosa* que predomina e está presente em 80% dos indivíduos com FC (21). Após a instalação bacteriana, a liberação de interleucina 8 pelo hospedeiro somada à presença bacteriana promovem intensa migração de neutrófilos para os pulmões afetados, o que posteriormente acarreta no aparecimento de substâncias pró-inflamatórias e na ocorrência de danos irreversíveis no tecido afetado (12).

As vias aeríferas superiores também são comprometidas em todos os pacientes, incluindo a ocorrência de polipose nasal caracterizada como prolapso da mucosa respiratória que ocorre em cerca de 20% dos pacientes (12, 22).

Quanto ao sistema reprodutor, a presença do muco espesso compromete o desenvolvimento do vaso deferente em indivíduos do sexo masculino, caracterizando a agenesia bilateral do vaso deferente (CBAVD) o que leva à ausência desta estrutura nos pacientes, acarretando na infertilidade. Em pacientes do sexo feminino, o muco cervical é espessado e impermeável, resultando na obstrução da entrada do espermatozoide no canal cervical, podendo causar redução na fertilidade (23).

Incidência da FC

A FC é a doença monogênica autossômica recessiva mais comum e grave, afetando 1 a cada 3200 nascidos vivos em caucasoides (24), sendo a frequência de heterozigotos igual a aproximadamente 1 em 23, e rara em negros e asiáticos (25). No Brasil, a incidência da FC varia de acordo com a região estudada. Enquanto na região Sul a frequência é de 1:2.500 nascimentos, no estado de São Paulo a frequência é igual a 1:8.403 (26).

A expectativa de vida dos pacientes varia muito e depende principalmente do tipo de mutação que este possui, da adesão ao tratamento e dos avanços no conhecimento sobre a fisiopatologia da doença. Na década de 70, apenas 50% dos pacientes atingiam os 15 anos de idade, estimativa que atualmente é de cerca de 95% (27). Nas últimas décadas, a melhora no tratamento médico, o desenvolvimento de terapias e drogas com maior eficiência, o aumento no número de profissionais especializados no atendimento de pacientes com FC, além da adesão ao tratamento foram os responsáveis pelo aumento da expectativa de vida de menos de 5 anos na década de 40 para 37 anos nos dias atuais (28).

Muitos fatores não genéticos determinam o curso da doença: desenvolvimento de novos antibióticos, reposição enzimática, condição socioeconômica do paciente, qualidade do atendimento clínico e acompanhamento recebido. Estes fatores influenciam o quadro clínico, evidenciando a influência dos fatores não genéticos na manifestação da doença (28).

Mickle e Cutting observaram que os pacientes que apresentavam a mutação F508del na sua forma homozigota tinham, em geral, prognóstico pior, havendo, portanto, associação desta mutação com a insuficiência pancreática, doença pulmonar grave e colonização precoce por *P. aeruginosa* (13). Formas não clássica da FC têm sido associadas com

mutações que reduzem, mas não eliminam, a função da proteína CFTR, essas incluídas entre as classes IV, V e VI (29).

Estudos atuais tem se esforçado para relacionar o genótipo do gene *CFTR* com a gravidade clínica apresentada pelos pacientes, entretanto, os resultados observados parecem não ser consistentes. Em relação ao quadro pancreático, há alguma relação da mutação com o fenótipo do paciente: mutações de classes I, II e III estão associadas à ocorrência de insuficiência pancreática, enquanto mutações de classes IV, V e VI geralmente correspondem à suficiência deste órgão (8). Com exceção da insuficiência pancreática, o curso clínico da FC não está correlacionado com as mutações no *CFTR* necessariamente. O genótipo parece de fato não ser determinante na modulação da gravidade do quadro clínico, uma vez que, indivíduos com a mesma mutação no gene *CFTR* apresentam manifestações clínicas distintas (30).

Genes modificadores

Embora seja uma doença monogênica clássica, a FC é uma doença que possui expressividade fenotípica variável, ou seja, a gravidade da doença pode ser muito diferente entre os pacientes com FC, sejam estes indivíduos não relacionados ou de uma mesma família. Além disso, indivíduos com FC que possuem as mesmas mutações podem apresentar grandes diferenças quanto à apresentação clínica da doença (31, 32). Há alguns anos se acreditava que as diferenças observadas entre os pacientes eram decorrentes das variações no tratamento recebido e no ambiente no qual os pacientes estavam inseridos, porém atualmente, sabemos que existem outros genes capazes de modular o fenótipo. Crianças com o mesmo genótipo, mesmo irmãos ou gêmeos monozigóticos, podem diferir

quanto à apresentação pulmonar (14). Gêmeos monozigóticos têm maior concordância em relação à apresentação clínica do que os gêmeos dizigóticos, forte evidência de que a gravidade da FC seja modulada por fatores genéticos secundários, além do *CFTR*, denominados genes modificadores (33).

Boyle em estudo com 41 pares de gêmeos com mesma mutação no gene *CFTR*, encontrou que entre os pares monozigóticos havia maior concordância em relação à gravidade do quadro pulmonar que entre os dizigóticos. Este dado sugere que, ainda que o genótipo *CFTR* seja idêntico, diferenças em outros genes podem influenciar o fenótipo (34).

Assim, a baixa correlação entre genótipo e gravidade da doença na FC tem levado à procura de outros genes que possam explicar essas variações fenotípicas. Genes que codificam outras proteínas como as do sistema imunológico, controle de inflamação, reparo do epitélio e transporte de íons por canais não CFTR, são candidatos a influenciar de forma indireta a gravidade da doença (35). Os genes modificadores podem influenciar a gravidade do fenótipo por vários mecanismos. Podem modular o fenótipo agindo em nível molecular, alternando a condução de cloro, regulando o *splicing* e a expressão do gene *CFTR*. E podem também modular a resposta inflamatória e susceptibilidade à infecção. Além disso, o quadro pulmonar desses pacientes pode ser modificado por genes associados com *clearance* mucociliar e os danos e reparo do tecido epitelial (6).

A lista de genes candidatos a modificadores é extensa e inclui genes predominantemente envolvidos no controle da infecção, imunidade e inflamação (36). Merlo e colaboradores apontam que outros genes classificados como modificadores estão relacionados ao tráfego de proteínas e canais iônicos alternativos (33). Outra possibilidade é a de que pacientes com FC tenham um sistema de defesa inato das vias aeríferas com

menor eficiência, o que os tornam mais susceptíveis ao ataque de vírus e bactérias (37). É provável que a resposta imune intensa do paciente em resposta à infecção bacteriana seja a responsável pelos danos pulmonares sofridos, outro motivo que leva ao estudo de genes do sistema imune e à identificação de genes modificadores (38).

Infecções pulmonares crônicas e insuficiência pancreática são os principais sintomas da FC. Terapias de reposição enzimática podem trazer benefícios ao quadro pancreático e nutricional dos pacientes, dessa forma, a doença pulmonar é considerada a causa da morbimortalidade dos pacientes com FC. As infecções pulmonares crônicas que ocorrem devido à diminuição de fluido na superfície das vias aeríferas, impedem o *clearance* eficiente levando à criação de um ambiente favorável para a instalação de colônias bacterianas. Como consequência, neutrófilos são constantemente recrutados nas vias aeríferas, causando resposta inflamatória persistente que pode variar entre os pacientes. Sendo assim, diferenças genotípicas entre os pacientes que podem levar a alterações no recrutamento de células de defesa e articulação do sistema imune são alvos de estudos para a identificação de genes modificadores da FC (39).

A identificação de genes modificadores pode ser útil de várias maneiras, uma vez que, estes podem fornecer pistas para o entendimento de mecanismos patogênicos da doença, o que futuramente pode contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias. Em adição, o conhecimento dos genes modificadores pode ser de relevância em triagens clínicas e no prognóstico, o que motiva a existência de inúmeros estudos voltados para esta área (31).

Genes modificadores da FC foram estudados a princípio por Zielinski e colaboradores em 1999 e desde então uma série de estudos tem buscado quais modificadores estão relacionado à modelagem fenotípica. A identificação de genes modificadores pode ser feita por estudos de correlação genótipo-fenótipo associados com o defeito básico da enfermidade. Sabe-se que os genes modificadores existem, mas o maior desafio da atualidade é identificar quais são esses genes e de que forma eles são capazes de alterar o fenótipo. Geralmente variações genéticas nos genes modificadores que tem pouco ou nenhum efeito em indivíduos saudáveis podem modificar a doença em pacientes com FC.

Estudos de genes modificadores nos fornecem uma nova forma de compreender a fisiopatologia, assim como sugere novas estratégias terapêuticas para a FC, tratamento e acompanhamento diferenciados. A identificação de genes modificadores irá prover a descoberta de novos caminhos da fisiopatologia e oferecer novos e potenciais prognósticos e terapias. Além disso, tais estudos permitirão a compreensão da diversidade fenotípica encontrada entre os pacientes com FC.

Gene *COX2*

O gene *COX2* (*Cyclo-oxygenase 2*), também chamado de *PTGS2* (*Prostaglandin-endoperoxide Synthase 2*) está localizado na região 1q31.1, tendo 8 Kb e originando um transcrito de 4,5 Kb no qual estão contidos 10 *exons* que levam à tradução de uma proteína de 604 aminoácidos (Figuras 7 e 8). A proteína sintetizada por este gene é uma enzima que recebe o nome de ciclooxigenase 2 (COX2) que apresenta função regulatória no processo

de conversão de ácido aracdônico livre em prostaglandina (PGH₂) que leva à formação de diversos prostanoídes (40). Os prostanoídes são mediadores importantes que controlam a homeostase e regulam processos inflamatórios em respostas à infecção ou trauma (41). Existem duas isoformas da enzima COX, identificadas como COX1 e COX2, cada uma com funções e papéis específicos (42). A isoforma COX1 é constitutivamente expressa na maioria das células do organismo, ao contrário da isoforma COX2 cuja expressão é induzida e ocorre geralmente em resposta a processos inflamatórios locais. O *COX2* foi identificado como um gene de resposta imediata cuja síntese é rapidamente elevada em resposta a diversas citocinas e fatores mitogênicos (43). Desta forma, situações patológicas levam ao aumento na expressão do gene *COX2*, cuja expressão pode ser reduzida por inibidores com função de atenuar condições inflamatórias crônicas (44). Embora a COX2 seja considerada como um agente pró-inflamatório, há evidências de que a enzima seja interessante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, uma vez que, estudos apontam que a COX2 desempenha outros papéis como anti-inflamatório, antifibrótico e antirômico (45).

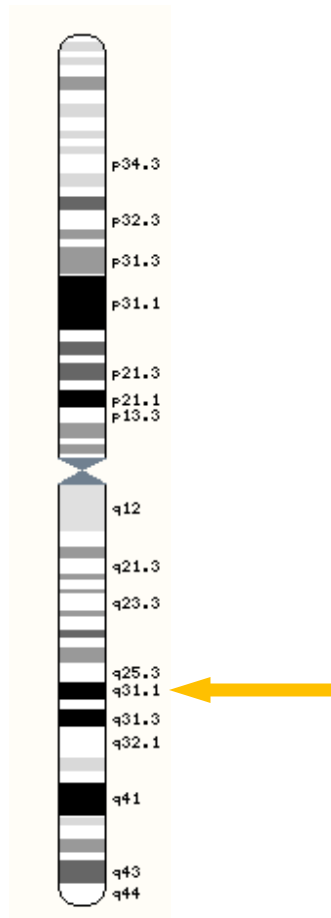


Figura 7. Posição do gene *COX2* no cromossomo 1. A seta aponta a região 1q31.1 no braço longo na qual o gene está localizado.



Figura 8. Estrutura do gene *COX2* com 8,64 kb. À esquerda é representada extremidade 5' na qual está localizada a região promotora. As caixas demonstram a sequência dos 10 *exons* que compõem o transcrito.

Diversos genes indutores e controladores de inflamação, como o fator de necrose tumoral (*TNF*) e a interleucina 6 (*IL-6*) apresentam polimorfismos de uma única base na região regulatória 5' dos genes; tais alterações tem a capacidade de modificar a expressão gênica e consequentemente interferem no processo inflamatório mediado pelas moléculas por eles traduzidas (46, 47). A extremidade 5' do gene *COX2* tem participação na regulação e expressão de tal gene, sendo composta por domínios como TATABox e diversos sítios de ligação a AMPc, fator nuclear B, IL-6, GATABox, o que sugere a existência de um complexo arranjo de fatores envolvidos em sua regulação (Figura 9). Estudos e experimentos que induziram mutações na porção 5' do *COX2* identificaram regiões críticas e elementos relacionados à indução da expressão do *COX2* (48, 49). Dessa forma, polimorfismos na região 5' UTR do gene possuem papel significativo na expressão deste, podendo levar a alterações na resposta inflamatória de indivíduos.

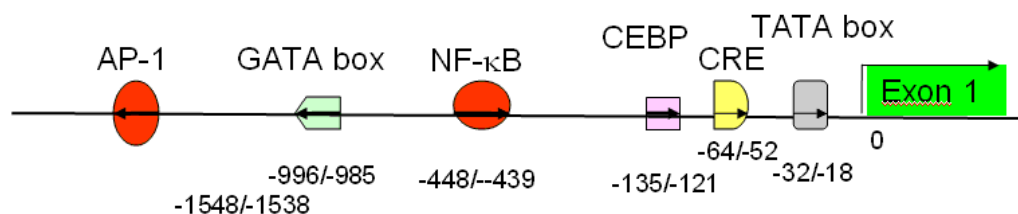


Figura 9. Região promotora 5' UTR do *COX2*. Os sítios regulatórios como GATA e TATABox são especificados no esquema. Extraído de <http://chem.rutgers.edu>.

Devido à interferência e controle do processo inflamatório apresentado pelo *COX2*, estudos classificaram tal gene como provável gene modificador da FC. Estudo de Czerska e colaboradores envolvendo 94 pacientes com FC que possuíam a mutação F508del em homozigose comparou os achados clínicos dos pacientes com a presença de variantes polimórficas nos genes *COX1* e *COX2*. Como resultado do estudo, foi evidenciado que

duas variantes no gene *COX2* apresentaram papel modificador no quadro clínico dos pacientes daquela região (50). Os polimorfismos -765G>C (rs20417) e 8473T>C (rs5275), sendo o primeiro localizado na região promotora do gene e o segundo na região 3'UTR permitiram a confirmação do papel modificador do *COX2* nos pacientes estudados. As variantes foram associadas à diminuição na concentração da proteína e degradação do RNAm de *COX2*. Uma vez que, o produto deste gene tem papel no sistema imune provocando vasodilatação e migração de células em tecidos inflamados, variações em genes relacionados à sua síntese podem levar a alterações no sistema imune do indivíduo e consequente alteração do fenótipo do pacientes com FC (50).

Altos níveis de *COX2*, normais em condições fisiológicas podem ter impacto negativo no efeito e gravidade da FC devido à intensa síntese de prostaglandina o que leva à intensificação do processo inflamatório. Como já evidenciado em estudos, a inflamação recorrente é um dos principais fatores que levam a rápida deterioração das vias aeríferas na FC e dessa forma, indivíduos com variantes cuja expressão gênica é reduzida estão associados ao quadro pulmonar mais leve (12).

Polimorfismo -765 G>C

Localizado na região promotora, este polimorfismo tem sido relatado como modificador da atividade gênica. A substituição de uma guanina por uma citosina na posição -765 localizada na região promotora do gene *COX2*, está presente em mais de 25% da população inglesa caucasóide. Estudo evidenciou que na presença do alelo C, o gene apresentou expressão significativamente reduzida (cerca de 30% menor) quando comparada com a presença do alelo G (51).

O mecanismo exato segundo qual o polimorfismo -765G>C reduz a atividade promotora do gene ainda é desconhecido. Entretanto, sabe-se que tal região é um sítio de ligação para o fator de ligação Sp1 que tem a função de ativar a transcrição (52). Porém, também é possível que este polimorfismo possa alterar a habilidade de ligação de outros elementos nesta região, incluindo Sp3, fator de ligação que pode competir pelo mesmo sítio de ligação que o Sp1, porém com ação contrária à expressão gênica (53).

O polimorfismo -765G>C tem sido amplamente associado à ocorrência de diversos tipos de câncer, entre eles o de colo retal (54, 58, 71, 72). A variante -765C aumenta de forma significativa o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer na população asiática, enquanto que o mesmo não foi observado em caucasóides, o que sugere o envolvimento de características genéticas próprias da etnia e também de fatores ambientais nos quais os indivíduos estão inseridos (54).

A presença de outros polimorfismos na região promotora de *COX2* foi relatada, porém nenhuma delas mostrou ser funcional ou associada a condições inflamatórias (55).

Polimorfismo 8473T>C

Localizado na região não traduzida (UTR) na extremidade 3' do DNA, este polimorfismo altera a expressão gênica pela alteração da estabilidade do RNA mensageiro e eficiência traducional da proteína. Toda região 3' UTR do *COX2* compreende mais que 2.000 bases, e há evidências de que esta região desempenhe papel na regulação da expressão do *COX2*. O nível de expressão do *COX2* é determinado em parte pela integração de múltiplos sinais que regulam eventos pós-transcricionais que são dependentes de sequências 3'UTR contidas no RNAm não processado (56).

A estabilidade e degradação do RNAm é parcialmente regulada pela ligação de proteínas à região 3' UTR do gene. É possível, portanto, que *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) nessa região possam afetar a afinidade de tal ligação, e desta forma, alterar a estabilidade e degradação do RNAm. A consequência funcional da variante 8473C ainda não é muito clara, mas devido a sua localização sabe-se que ela pode afetar a estabilidade e degradação do RNAm, diminuindo a concentração da enzima COX2 (57).

Estudo realizado por Lopez-Campos e colaboradores (2008) revelou que o polimorfismo 8473T>C confere susceptibilidade à sarcoidose, doença multifatorial que afeta o pulmão e apresenta elevada resposta inflamatória. Portadores do genótipo CC apresentaram maior risco de desenvolver a doença, provavelmente devido ao fato de o polimorfismo se localizar em uma região regulatória que diminua a expressão do gene em macrófagos alveolares (58).

Os polimorfismos 8473T>C e -765G>C já foram descritos como envolvidos no processo de carcinogênese, alterando a susceptibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento de câncer. A localização desses SNPs evoca a importância dessas variações, uma vez que, podem conferir alteração no produto gênico, sendo que o genótipo 8473C mostrou aumento de cerca de duas vezes no risco de câncer de próstata (59).

Gene *IFRD1*

O gene *IFRD1* (*Interferon-Related Developmental Regulator 1*) localizado na região 7q31.1 apresenta mais de 52 Kb, que originam um transcrito com 1834 bases, composto por 13 *exons* responsáveis pela codificação de uma proteína constituída por 451

aminoácidos (Figuras 10 e 11). A proteína codificada recebe o nome de IFRD1, ou também Tis7 e PC4 (60).

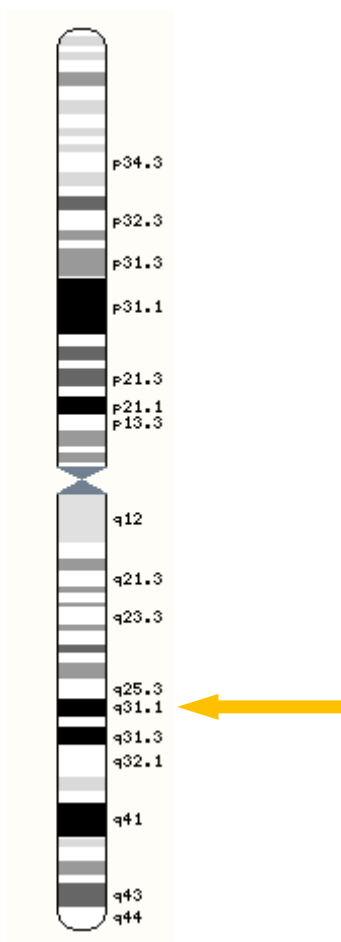


Figura 10. Posição do gene *IFRD1* no cromossomo 7. A seta aponta a região 7q31.1 no braço longo na qual o gene está localizado.



Figura 11. Estrutura do gene *IFRD1* com 52,38 kb. À esquerda é representada extremidade 5' na qual está localizada a região promotora. As caixas demonstram a sequência dos 13 exons que compõe o transcrito.

Gu e colaboradores em 2009, pela varredura no genoma em busca de SNPs, identificaram o gene *IFRD1* (*Interferon Related Developmental Regulator 1*) como modificador da doença pulmonar em pacientes com FC. A IFRD1, produto deste gene é co-regulador de transcrição dependente de histona desacetilase expresso no final da diferenciação de neutrófilos e possui papel na função efetora dos neutrófilos, característica confirmada por meio de PCR quantitativo e estudos com camundongos *knockout* para o gene (61).

O *IFRD1* é altamente expresso em células sanguíneas humanas e com elevados níveis de expressão em neutrófilos, nos quais a IFRD1 tem função nas etapas finais de diferenciação destas células (62).

Especificamente, o SNP rs7817, que consiste na troca de uma base citosina (C) por timina (T) na posição 57460, região 3'UTR do gene *IFRD1*, parece estar relacionado com a gravidade da doença pulmonar. Foi constatado que o genótipo heterozigoto (CT) estava associado com menor função pulmonar que os homozigotos (CC e TT). Embora o gene *IFRD1* esteja localizado no cromossomo 7, assim como o gene *CFTR*, o citado estudo mostrou que não existem evidências de ligação entre os dois genes e que portanto, eles possuem segregação independente. Além disso, demonstrou-se que SNPs localizados ao longo da sequência de bases do *IFRD1* contém sítios de ligação de microRNAs (61).

Vadivelu e colaboradores realizaram estudo utilizando como modelos camundongos *knockout* para o *IFRD1*. *In vivo*, a infecção dos camundongos com *P. aeruginosa* levou à significativa redução no *clearance* bacteriano quando comparado ao camundongo selvagem o qual expressa o *IFRD1* corretamente. Verificou-se também melhora no fenótipo dos camundongos, com menor perda de peso e diminuição da inflamação tanto nas vias aeríferas quanto de forma sistêmica, sugerindo que o *IFRD1* está de fato envolvido na

resposta inflamatória em quadros infecciosos. Em pacientes com FC, neutrófilos são constantemente recrutados nas vias aeríferas, causando resposta inflamatória persistente (63). A gravidade dos sintomas inflamatórios, entretanto, varia muito mesmo entre pacientes com mesmo genótipo *CFTR*, um motivo adicional que leva ao estudo de genes envolvidos na produção e maturação de neutrófilos (64). O *IFRD1* é classificado como suposto modificador da FC devido à sua capacidade de modular a amplitude da resposta imune realizada por neutrófilos (61).

II - Objetivo

Os objetivos deste estudo foram:

- Na amostra estudada, determinar a frequência dos polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene *COX2*.
- Na amostra estudada, determinar a frequência do polimorfismo 57460C>T no gene *IFRD1*.
- Verificar a associação entre os polimorfismos e as variáveis clínicas dos pacientes: sexo, raça, idade, início dos sintomas, diagnóstico, sintomas digestivos, sintomas pulmonares, Índice de Massa Corpórea (IMC), polipose nasal, diabetes mellitus, osteoporose, insuficiência pancreática, íleo meconial, saturação de oxigênio transcutânea, espirometria, escores clínicos, *P. aeruginosa* mucoide, *P. aeruginosa* não mucoide e *S. aureus*.

III – Casuística e métodos

Casuística

A casuística deste estudo foi composta por 103 pacientes com FC em seguimento no Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, coordenado pelo Dr. Antônio Fernando Ribeiro e Dr. José Dirceu Ribeiro.

Como critério de inclusão foram selecionados pacientes com resultados alterados em pelo menos dois testes do suor, com valores de cloro iguais ou superiores a 60 mEq/L, uma vez que, o teste do suor é a forma mais eficaz e garantida de diagnosticar um paciente com FC.

Os sujeitos deste estudo já possuem o genótipo *CFTR* determinado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa para algumas mutações pertencentes às classes I, II e III. As mutações do gene *CFTR* estudadas no laboratório e utilizadas na casuística deste projeto são: F508del, G542X, G551D, R553X, R1162X e N1303K.

A casuística foi analisada em dois momentos distintos. Primeiramente foram analisados todos pacientes (103), independente do genótipo *CFTR* apresentado. Posteriormente, a fim de tornam a casuística genotipicamente uniforme, foram analisados apenas os pacientes com genótipo *CFTR* composto por mutações de classes mais graves (I e II). Nesta etapa foram estudados 66 pacientes.

Na análise de gravidade clínica relacionada aos genes modificadores não se faz necessário grupo de indivíduos controles saudável, já que, a comparação clínica se baseia na relação entre os diferentes genótipos para os polimorfismos analisados.

Métodos

Coleta do material

O material biológico de análise consiste em amostras de DNA presentes no banco de material biológico do Laboratório de Genética Molecular / FCM – Unicamp, previamente obtido com consentimento dos pacientes pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – Unicamp e o documento com a aprovação do mesmo se encontra disponível na sessão de anexos.

Coleta de dados clínicos

As características do quadro clínico dos pacientes foram recolhidas e organizadas pelo Ms Fernando Augusto Lima Marson do grupo de FC pela análise dos prontuários dos pacientes formando um extenso banco de dados com as informações fenotípicas dos indivíduos. As variáveis clínicas analisadas neste estudo são apresentadas a seguir:

Índice de Massa Corpórea (IMC): foi calculado para pacientes maiores que 19 anos através da fórmula $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$. Já para pacientes com menos de 19 anos os dados de categorização para o IMC foram obtidos pelo Z-score para o IMC, sendo os cálculos realizados pelos softwares WHO ANTHRO (para crianças de 0 a 5 anos incompletos) e WHO ANTHRO PLUS (para crianças de 5 a 19 anos incompletos), fornecidos gratuitamente pela World Health Organization (WHO).

Idade do paciente e idade ao diagnóstico: idade atual do paciente e idade na qual houve o primeiro teste de suor alterado. Utilizado como medida para amenizar a diferença de idade entre os pacientes incluídos no estudo, sendo mais grave o quadro clínico quanto antes o diagnóstico realizado, excetuando-se o viés de amostragem, que inclui o diagnóstico por triagem neonatal. Os valores foram distribuídos de acordo com o genótipo de cada polimorfismo e foram comparados com os grupos para a idade: 0 (menor idade $\leq$ 154 meses) e 1 (maior idade $>$ que 154 meses); e para a idade ao diagnóstico: 0 (menor idade $\leq$ 24 meses) e 1 (maior idade $>$ que 24 meses).

Primeiros sintomas clínicos: classificado de acordo com a primeira apresentação clínica relatada pelos pais, tanto do quadro pulmonar como do digestivo. Os períodos obtidos em meses foram analisados diretamente em relação aos genótipos obtidos para os genes modificadores utilizando os grupos para o início dos sintomas digestivos: 0 (menor idade $\leq$ 3 meses) e 1 (maior idade $>$ que 3 meses); e dos sintomas pulmonares: 0 (menor idade $\leq$ 6 meses) e 1 (maior idade $>$ que 6 meses).

Período até a 1º colonização: importante marcador da condição clínica do paciente, já que a pior evolução clínica é associada à colonização precoce, principalmente pela *P. aeruginosa*. Os períodos em meses foram comparados diretamente utilizando duas classes: 0 (menor idade $\leq$ 31 meses) e 1 (maior idade $>$ que 31 meses). A bactéria utilizada como marcador foi a *P. aeruginosa*, selecionada por associar-se a maior gravidade clínica e ser frequentemente isolada nos pacientes, permitindo melhor análise estatística dos dados.

Microrganismos isolados: foi realizado o levantamento da microbiota pulmonar recente de cada paciente, sendo os principais microrganismos associados à FC, a *P. aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* e *Staphylococcus aureus*. Os protocolos de análise utilizados para a identificação dos microrganismos fazem parte da rotina diagnóstica laboratorial do laboratório de Patologia Clínica, não sendo objetivo deste estudo.

A colonização/infecção crônica (isolamento do microrganismo em pelo menos duas amostras de escarro a cada ano) foi relacionada aos genótipos encontrados. Como marcadores de gravidade nesta pesquisa foram utilizados as bactérias: *P.aeruginosa* mucoide e não mucoide, *A. xylosoxidans*, *B. cepacia* e *S. aureus*, por apresentarem importância clínica e por terem maior frequência no exame de cultura de rotina diagnóstica. As análises foram realizadas tendo duas possibilidades: a presença da bactéria (exame positivo) e a ausência da mesma (exame negativo).

Outros marcadores da condição clínica: Também se buscou relatar outras características de importância clínica na FC, a saber: polipose nasal (diagnosticada pelo exame ambulatorial e/ou rinoscopia), osteoporose (diagnosticada pela densiometria óssea), íleo meconial (IM), diabetes mellitus (diagnosticado pelo exame de tolerância a glicose) e insuficiência pancreática (diagnosticada pelo esteatócrito) que foram avaliados como aspecto secundário ao quadro clínico do paciente e sendo obtidos nos exames anexados ao prontuário do mesmo. A denotação utilizada para a análise estatística foi: presença do sintoma/doença secundária (+) e ausência (-) (65).

Escore de Bhalla: consiste na avaliação tomográfica capaz de acompanhar a doença pulmonar. A pontuação é feita em nove categorias, sendo que cada uma tem valor igual a três pontos cada. Conforme mais alta a pontuação, maior a gravidade da doença pulmonar.

Escore de Kanga: responsável pela avaliação da exacerbação pulmonar aguda. São avaliados cinco sintomas: tosse, produção de secreção, perda de apetite, dispneia e perda de energia. Além disso, são verificados cinco sinais físicos: temperatura, peso, frequência respiratória, chiado e estertoração. Cada critério vale de 1 a 5 pontos, sendo que pontuações mais altas indicam indivíduos com maior grau de acometimento.

Escore de Shwachman-Kulczycki (SK): consiste na avaliação do estado geral do paciente correlacionando à nutrição, atividade geral, exames físicos e achados radiológicos. Para cada item avaliado é conferida uma pontuação que pode atingir o máximo de 25. Quanto menor a pontuação, pior o quadro clínico.

Espirometria: **CVF** (Capacidade Vital Forçada) - representa o volume máximo de ar exalado com esforço máximo, a partir do ponto de máxima inspiração. **VEF1%** (Volume expiratório forçado) – representa o volume de ar exalado no primeiro segundo. **FEV 25-75** (Fluxo Expiratório Forçado): é o fluxo expiratório forçado médio na faixa intermediária da CVF, isto é, entre 25 e 75% da curva de CVF.

Amplificação gênica

Para a amplificação das regiões gênicas de interesse, amostras de DNA de cada paciente foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica permite que a partir do DNA genômico do indivíduo sejam feitas milhares de cópias da sequência alvo que será analisada. As reações consistem em repetição de ciclos de temperatura, o que permite que a enzima polimerase faça novas cópias idênticas ao molde, entretanto apenas da região delimitada pelos *primers* (oligonucleotídeos). O ciclo de temperaturas é realizado por um aparelho termociclador, que varia os valores de temperatura de maneira cíclica. Para cada reação realizada são utilizadas diferentes concentrações de reagentes, bem como, temperaturas de anelamento distintas, estas últimas variando de acordo com a composição de nucleotídeos dos *primers* e do fragmento que será amplificado (Tabelas 1 e 2).

A visualização dos fragmentos resultantes das amplificações gênicas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 180V por 2 horas para os polimorfismos no gene *COX2* (Figuras 12 e 13) e em gel de agarose 1,5% a 90V por 1,5 hora para o polimorfismo no gene *IFRD1* (Figura 14). Em seguida foi realizada a coloração em solução de brometo de etídeo e visualização no scanner Typhoon™ (GE, Healthcare).

Tabela 1. Condições das reações de PCR conduzidas para os polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T.

Reagente (µL)	<i>COX2</i>		<i>IFRD1</i>
	-765G>C	8473T>C	57460C>T
Água bidestilada	19,0	19,0	35,7
Taq <i>Buffer</i> 10X com KCl	3,0	3,0	-
Taq <i>Buffer</i> 10X com (NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	1,2	4,0
dNTP (25 mM cada)	3,0	3,0	2,0
<i>Primers</i> (0.2 pMoles cada)	0,8	0,8	1,0
Taq polimerase (5 Unidades)	0,4	0,4	0,3
DNA genômico	1,0	1,0	1,0

COX2= *Ciclo-oxygenase 2*; *IFRD1*= *Interferon Related Developmental Regulator 1*; µL= microlitro; KCl= cloreto de potássio; (NH₄)₂SO₄= sulfato de amônio; MgCl₂= cloreto de magnésio, dNTP= desorribonucleotídeo trifosfatado; pMoles= picomoles).

Tabela 2. Características dos *primers* e fragmentos amplificados utilizados para a detecção dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T.

	Sequência de <i>primers</i>		Fragmento	Ta
-765G>C	5'-ATTCTGGCCATCGCCGCTTC-3' e 5'-CTCCTTGTTTCTTGGAAGAGACG-3'	(66)	157 pb	60,4°C
8473 T>C	5'-GAAATTTTAAAGTACTTTTGAT-3'e 5'-CTTTTACAGGTGATTCTACCC-3	(67)	177 pb	50,2°C
57460 C>T	5'-AGATAAGAGAGCAGATGTT-3' e 5'- GCTGTCTTCATAAATAAAT-3'	*	547 pb	62°C

Ta= temperatura de anelamento dos *primers*; Pb= pares de bases; °C= graus Celsius. *A sequência do *primer* para identificação do polimorfismo 57460C>T foi determinada pela aluna na elaboração deste projeto.

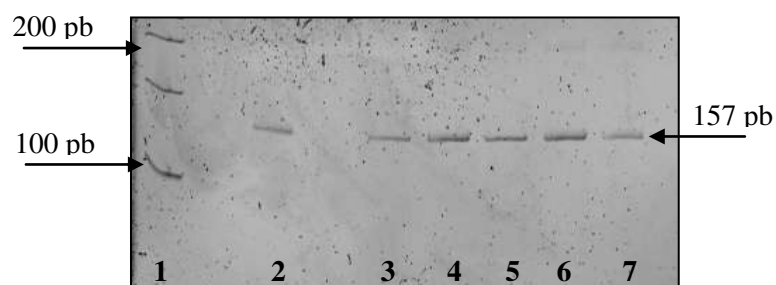


Figura 12. Eletroforese de PCR em gel de poliacrilamida 12% para a visualização do fragmento de 157 pb amplificado contendo o sítio do polimorfismo -765G>T. Coluna 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Colunas 2 a 7: amplificado com 157 pb cada. pb= pares de bases.

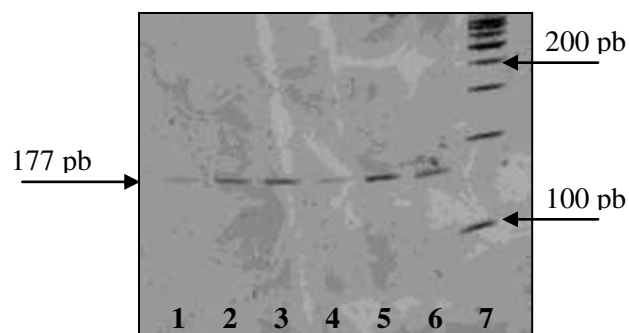


Figura 13. Eletroforese de PCR em gel de poliacrilamida 12% para a visualização da banda de 177 pb contendo o sítio do polimorfismo 8473T>C. Coluna 7: Marcador de peso molecular de 100 pb. Colunas 1 a 6: amplificado com 177 pb cada. pb= pares de bases.

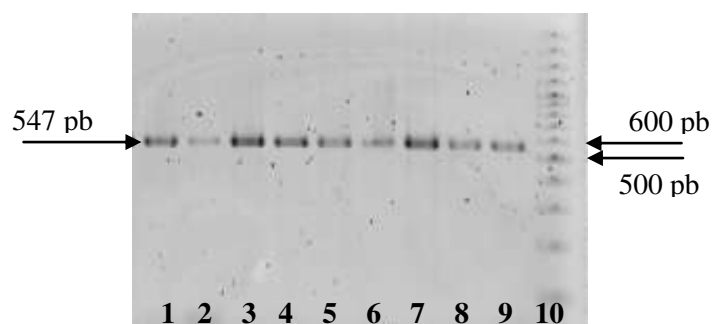


Figura 14. Eletroforese de PCR em gel de agarose 1,5% para a visualização da banda de 547 pb contendo o sítio do polimorfismo 57460C>T . Coluna 10: Marcador de peso molecular de 100 pb. Colunas 1 a 9: amplificado com 547 pb cada. pb= pares de bases.

Digestão enzimática

Para diferenciar e analisar as variantes alélicas, após a PCR foi realizada a técnica de digestão enzimática. Tal técnica consiste no reconhecimento específico de uma enzima de restrição por uma dada sequência de bases. Quando a enzima é submetida à sua temperatura de ativação ela é capaz de provocar a quebra da molécula de DNA em fragmentos distintos ao reconhecer sua sequência alvo, ao contrário disso, quando tal sequência não é encontrada, o fragmento não sofre quebra e mantém seu tamanho original. As enzimas utilizadas neste projeto, bem como suas respectivas temperaturas de restrição e fragmentos gerados são apresentadas a seguir (Tabelas 3 e 4).

Cada reação realizada foi incubada em banho maria na temperatura de ativação por um período de 16 horas (*overnight*) e em seguida aplicada em gel de poliacrilamida 12% com voltagem de 180V por 4 horas. Para finalizar a análise, após o período de corrida, o gel é colocado em solução de brometo de etídeo por 15 minutos e em seguida visualizado no scanner Typhoon™ (GE, Healtcare).

De acordo com o padrão de bandas visualizadas foi identificado o genótipo dos pacientes para a região gênica analisada (Figuras 15, 16 e 17). Os fragmentos resultantes da digestão para os três possíveis genótipos são apresentados em tabela (Tabela 5).

Tabela 3. Enzimas utilizadas para cada reação de digestão enzimática de acordo com o polimorfismo.

Polimorfismo	Enzima	Marca	Temperatura de ativação
-765G>C	<i>BstUI</i>	New England BioLabs	60°C
8473T>C	<i>BclI</i>	New England BioLabs	50°C
57460C>T	<i>BstNI</i>	New England BioLabs	60°C

Tabela 4. Protocolo da reação de digestão enzimática aplicado para a detecção dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T.

Volume (µL)	Reagente
10,0	Amplificado (PCR)
2,5	Água bidestilada
2,0	Tampão da enzima
0,5	Enzima

µL= microlitro.

Tabela 5. Descrição dos fragmentos resultantes após realização da técnica de digestão enzimática de acordo com o genótipo apresentado pelo paciente.

-765G>C		8473T>C		57460C>T	
Genótipo	Fragmentos (pb)	Genótipo	Fragmentos (pb)	Genótipo	Fragmentos (pb)
GG	134 + 23	TT	177	TT	444 + 103
GC	157 + 134 + 23	TC	177 + 156 + 21	CT	444 + 326 + 118 + 103
CC	157	CC	156 + 21	CC	326 + 118 + 103

pb= pares de bases; G= guanina; C= citosina; T= timina.

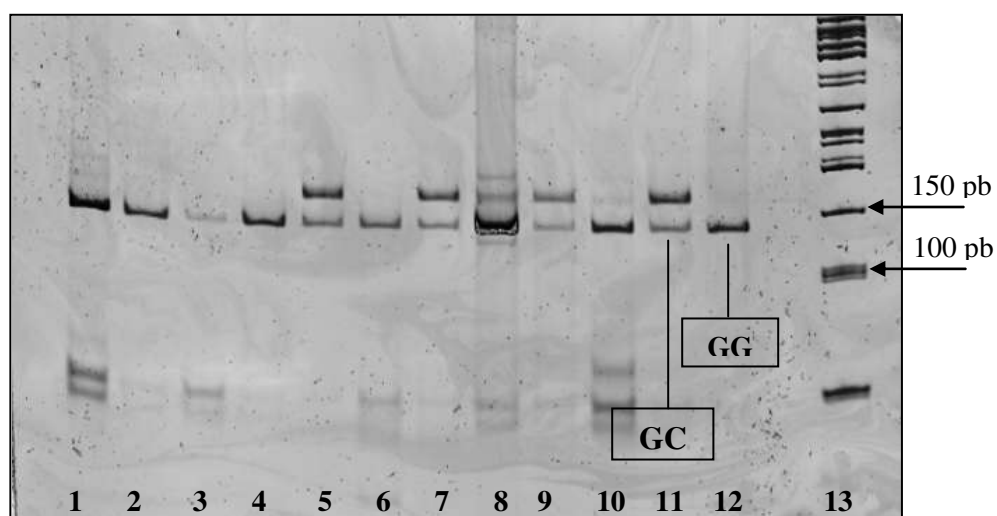


Figura 15. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo -765G>C. Colunas 1, 2, 3, 4, 6, 10 e 12: pacientes com genótipo GG. Colunas 5, 7, 8 e 11: pacientes com genótipo GC. Coluna 13: Marcador de peso molecular de 50 pb. pb= pares de bases.

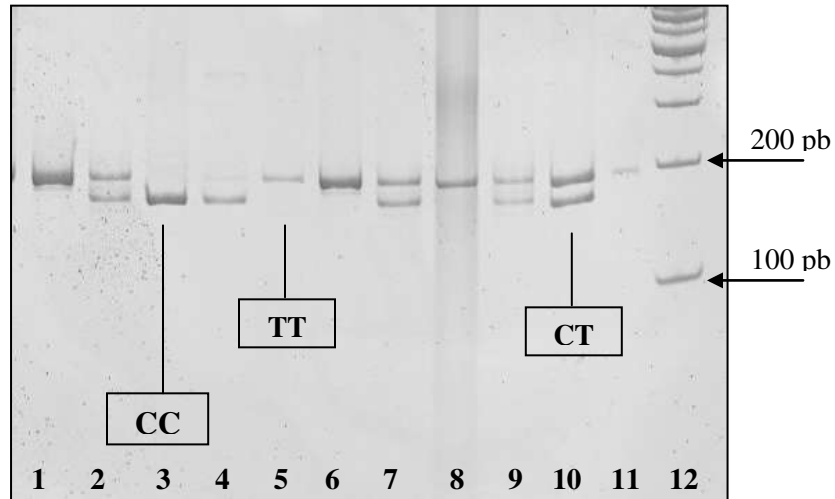


Figura 16. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo 84673T>C. pb= pares de bases. Coluna 1: amplificado com 177 pb. Colunas 2, 7, 9 e 10: pacientes com genótipo CT. Colunas 3 e 4: pacientes com genótipo CC. Colunas 5, 6, 8 e 11: pacientes com genótipo TT. Coluna 12: Marcador de peso molecular de 100 pb. pb= pares de bases.

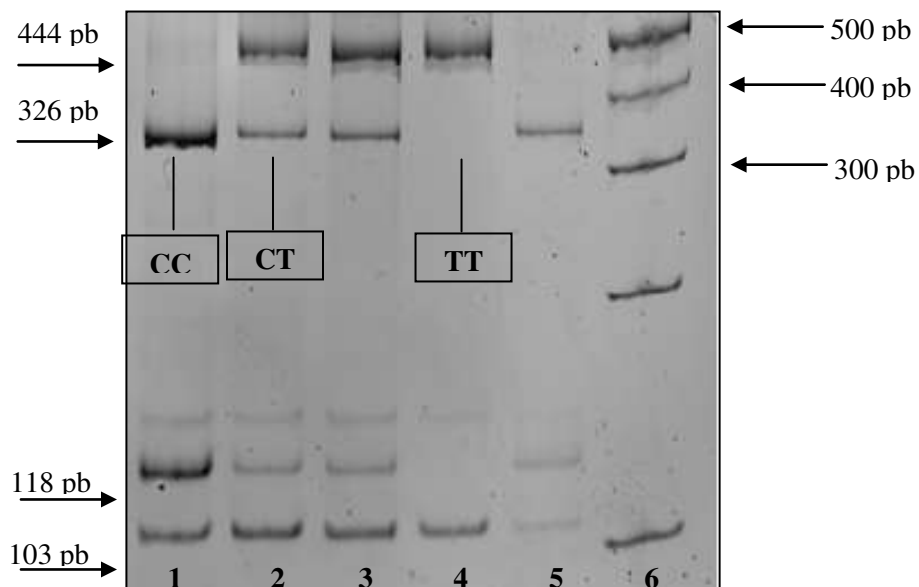


Figura 17. Eletroforese de digestão enzimática para detecção do polimorfismo 54760C>T. Colunas 1 e 5: pacientes com genótipo CC. Colunas 2 e 3: pacientes com genótipo CT. Coluna 4: pacientes com genótipo TT. Coluna 6: Marcador de peso molecular de 100 pb. pb= pares de bases.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) v.17.0, Open Epi v.5.0 e pelo programa R versão 2.12. Os dados foram comparados com os testes qui quadrado e exato de Fisher para as variáveis categóricas e pelos testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para variáveis numéricas. Para todas as análises foi adotado o valor de $p \leq 0,05$. Os dados do genótipo para o gene *CFTR* foram utilizados na análise complementar a fim de denotar a influência do mesmo em associação com os polimorfismos.

IV - Resultados

Dos 103 pacientes analisados, 55 eram do sexo feminino e 97 caucasoides. A descrição da frequência genotípica de cada polimorfismo analisado no estudo está relatada na **tabela 6**. O polimorfismo -765G>C no gene *COX2* não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$).

Os dados relativos às variáveis analisadas encontram-se sumarizadas nas tabelas 7 a 10 para os pacientes sem considerar o genótipo para o gene *CFTR* como condicionante para a gravidade clínica da doença. Nas tabelas de 11 a 14, foi realizada a associação com as variáveis clínicas dos pacientes que possuíam as duas mutações do gene *CFTR* identificadas, sendo que todas as mutações incluídas no estudo foram pertencentes à classe I, II e III, que são associadas a maior gravidade clínica da doença. Para a análise da relação com as variáveis clínicas nem sempre foi possível analisar os 103 pacientes por falta de dados clínicos.

Na **tabela 7**, está descrita a associação dos polimorfismos incluídos no estudo com as variáveis clínicas relacionadas à categorização da população, sendo elas o sexo, raça e idade dos pacientes. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Tabela 6. Frequência alélica, frequência genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos 103 pacientes com fibrose cística com relação aos polimorfismos estudados.

Genótipo	Número de indivíduos	Frequência genotípica	Frequência alélica	χ^2
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>				
CC	1	1,0	C – 0,22	5,52 0,05>p<0,01*
GC	44	42,7	G – 0,78	
GG	58	56,3		
Total	103	100,0		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>				
CC	8	8,1	C – 0,33	1,84 p>0,05
CT	50	50,5	T – 0,67	
TT	41	41,4		
Total	99	100,00		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>				
CC	28	31,5	C – 0,52	3,65 p>0,05
CT	35	39,5	T – 0,48	
TT	25	28,1		
Total	89	100,0		

COX2 = Cyclo-oxygenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; χ^2 = qui-quadrado; C= citosina; T= timina ; G= guanina. *O polimorfismo -765G>C no gene *COX2* não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com valor de probabilidade estatística inferior a 0,05.

Tabela 7. Sexo, raça e idade dos 103 pacientes com fibrose cística com relação aos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T .

Genótipo	Sexo		Raça		Idade		Total
	Feminino	Masculino	Caucasoide	Não caucasóide	≤154 meses	> 154 meses	
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>							
CC + GC	24	20	41	3	25	19	44
GG	31	28	56	3	38	21	59
Total	55	48	97	6	63	40	103
p	1,0		1,0		0,54		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>							
CC + CT	30	28	54	4	35	23	58
TT	22	19	39	2	29	12	41
Total	52	47	93	6	64	35	99
p	1,0		1,0		0,394		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>							
CC	14	14	26	2	18	10	28
CT	19	16	33	2	22	13	35
TT	15	10	24	1	16	9	25
Total	48	40	83	5	56	32	88
p	0,765		0,882		0,992		

COX2= Cyclo-oxigenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Na **tabela 8**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com as variáveis clínicas relacionadas à idade de início dos sintomas, idade do diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Na **tabela 9**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com as variáveis clínicas relacionadas à comorbidades da fibrose cística. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa, exceto a presença de polipose nasal, que apresentou associação com o polimorfismo 8473T>C ($p=0,022$). Houve um *odds ratio* de 5,552 (95 IC: 1,318-38,27) para a combinação genotípica TT + TC do polimorfismo 8473T>C no gene COX2 em relação à polipose nasal.

Tabela 8. Associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares em pacientes com fibrose cística.

Genótipo	Início dos sintomas			Diagnóstico			Sintomas digestivos			Sintomas pulmonares		
	≤3 meses	> 3 meses	Total	≤24 meses	> 24 meses	Total	≤3 meses	> 3 meses	Total	≤6 meses	> 6 meses	Total
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>												
CC + GC	26	17	43	28	14	42	22	20	42	26	17	43
GG	39	19	58	39	18	57	30	24	54	36	21	57
Total	65	36	101	67	32	99	52	44	96	62	38	100
p	0,532			1,0			0,837			0,837		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>												
CC + CT	40	17	57	36	19	55	34	20	54	36	20	56
TT	23	17	40	28	12	40	18	22	40	24	16	40
Total	63	34	97	64	31	95	52	42	94	60	36	96
p	0,280			0,665			0,097			0,676		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>												
CC	19	9	28	16	10	26	16	10	26	18	10	28
CT	19	15	34	21	13	34	16	17	33	19	15	34
TT	17	8	25	20	5	25	13	12	25	16	8	24
Total	55	32	87	57	28	85	45	39	84	53	33	86
p	0,525			0,242			0,595			0,666		

COX2 = Cyclo-oxigenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Tabela 9. Associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com IMC, presença de polipose nasal, diabetes, osteoporose, insuficiência pancreática e íleo meconial em pacientes com fibrose cística.

Genótipo	IMC			Polipose nasal			Diabetes			Osteoporose			Insuficiência pancreática			Íleo meconial		
	Magreza + Magreza acentuada	Outros	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>																		
CC + GC	9	35	44	9	35	44	11	33	44	5	39	44	43	1	44	8	36	44
GG	7	52	59	10	49	59	8	51	59	9	50	59	55	4	59	1	48	59
Total	16	87	103	19	84	103	19	84	103	14	89	103	98	2	103	19	84	103
p	0,278			0,798			0,199			0,773			0,390			1,0		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>																		
CC + CT	10	48	58	13	45	58	13	45	58	8	50	58	54	4	58	14	44	58
TT	5	36	41	2	39	41	6	35	41	5	36	41	41	0	41	5	36	41
Total	15	84	99	15	84	99	19	80	99	13	86	99	95	4	99	19	80	99
p	0,578			0,022*			0,439			1,0			0,140			0,196		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>																		
CC	5	23	28	3	25	28	7	21	28	6	22	28	27	1	28	6	22	28
CT	4	31	35	5	30	35	5	30	35	4	31	35	33	2	35	5	30	35
TT	3	22	25	3	22	25	4	21	25	3	22	25	25	0	25	4	21	25
Total	12	76	88	11	71	88	16	12	88	13	75	88	85	3	88	15	73	88
p	0,740			0,910			0,531			0,502			0,331			0,750		

IMC= Índice de Massa Corpórea; *COX2* = *Cyclo-oxigenase 2*; *IFRD1*= *Interferon-Related Developmental Regulator 1*; C= citosina; T= timina ; G= guanina. *O polimorfismo 8473T>C no gene *COX2* apresentou valor de p significativo em associação a presença de polipose nasal.

Na **tabela 10**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com a presença das bactérias *P. aeruginosa* mucoide e não mucoide e *S.aureus* em pacientes com fibrose cística. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Tabela 10. Associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com a presença das bactérias *P. aeruginosa* mucoide e não mucoide e *S.aureus* em pacientes com fibrose cística.

Genótipo	<i>P. aeruginosa</i> mucoide			<i>P. aeruginosa</i> não mucoide			<i>S. aureus</i>		
	Negativa	Positiva	Total	Negativa	Positiva	Total	Negativa	Positiva	Total
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>									
CC + GC	26	18	44	16	28	44	12	32	44
GG	28	31	59	23	36	59	8	51	59
Total	54	49	103	39	64	103	20	83	103
p	0,319			0,839			0,129		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>									
CC + CT	31	27	58	24	34	58	13	45	58
TT	22	19	41	14	27	41	6	35	41
Total	53	46	99	38	61	99	19	80	99
p	1,0			0,532			0,439		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>									
CC	13	15	28	7	21	28	6	22	28
CT	21	14	35	16	19	35	4	31	35
TT	13	12	25	9	16	25	6	19	25
Total	47	41	88	32	56	88	16	72	88
p	0,553			0,230			0,383		

COX2= Cyclo-oxygenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Na **tabela 11**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com as variáveis clínicas relacionadas à categorização da população, sendo elas o sexo, raça e idade dos pacientes. Os pacientes incluídos nessa análise apresentavam duas mutações identificadas no gene *CFTR*. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Na **tabela 12**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com as variáveis clínicas relacionadas à idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares. Os pacientes incluídos nessa análise apresentavam duas mutações identificadas no gene *CFTR*. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Na **tabela 13**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com as variáveis clínicas relacionadas à comorbidades da fibrose cística. Os pacientes incluídos nessa análise apresentavam duas mutações identificadas no gene *CFTR*. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa, exceto a presença de íleo meconial que apresentou associação com o polimorfismo 8473T>C ($p=0,028$). Houve um *odds ratio* de 5,486 (95 IC: 1,192-40) para a combinação genotípica CC + GC do polimorfismo 8473T>C no gene *COX2* em relação à ocorrência de íleo meconial.

Na **tabela 14**, está descrita a associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com a presença das bactérias *P. aeruginosa* mucoide e não mucoide e *S.aureus* em pacientes com fibrose cística. Os pacientes incluídos nessa análise apresentavam duas mutações identificadas no gene *CFTR*. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Tabela 11. Sexo, raça e idade dos pacientes portadores de fibrose cística com as duas mutações identificadas no gene *CFTR* com relação aos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T .

Genótipo	Sexo		Raça		Idade		Total
	Feminino	Masculino	Caucasoide	Não caucasóide	≤154 meses	> 154 meses	
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>							
CC + GC	17	11	26	2	19	9	28
GG	17	21	36	2	26	12	38
Total	34	32	62	4	45	21	66
p	0,150		0,570		0,585		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>							
CC + CT	19	15	31	3	23	11	34
TT	14	15	28	1	20	9	29
Total	33	30	59	4	43	20	63
p	0,617		0,618		1,0		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>							
CC	9	10	17	2	13	6	19
CT	11	8	18	1	13	6	19
TT	11	8	19	0	12	7	19
Total	31	26	54	3	38	19	57
p	0,754		0,236		0,925		

COX2= Cyclo-oxigenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Tabela 12. Associação dos polimorfismos estudados com idade de início dos sintomas, idade ao diagnóstico, presença de sintomas digestivos e pulmonares em pacientes com fibrose cística com as duas mutações *CFTR* identificadas.

Genótipo	Início dos sintomas			Diagnóstico			Sintomas digestivos			Sintomas pulmonares		
	≤3 meses	> 3 meses	Total	≤24 meses	> 24 meses	Total	≤3 meses	> 3 meses	Total	≤6 meses	> 6 meses	Total
Polimorfismo -765G>C do gene <i>COX2</i>												
CC + GC	16	12	28	21	7	28	15	13	28	14	14	28
GG	25	13	38	26	11	37	19	18	37	25	13	38
Total	41	25	66	47	18	65	34	31	65	39	27	66
p	0,332			0,446			1,0			0,217		
Polimorfismo 8473T>C do gene <i>COX2</i>												
CC + CT	23	11	34	25	8	33	22	11	33	19	15	34
TT	16	13	29	20	9	29	12	17	29	18	11	29
Total	39	24	63	45	17	62	34	28	62	37	26	63
p	0,435			0,581			0,073			0,796		
Polimorfismo 57460C>T do gene <i>IFRD1</i>												
CC	12	7	19	10	8	18	10	8	18	12	7	19
CT	11	8	19	14	5	19	11	8	19	9	10	19
TT	11	8	19	15	4	19	9	10	19	11	8	19
Total	34	23	57	39	17	56	30	26	56	32	25	57
p	0,929			0,271			0,793			0,607		

COX2= Cyclo-oxigenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Tabela 13. Associação dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com IMC, presença de polipose nasal, presença de diabetes, osteoporose, insuficiência pancreática e íleo meconial em pacientes com fibrose cística com as duas mutações *CFTR* identificadas.

Genótipo	IMC			Polipose nasal			Diabetes			Osteoporose			Insuficiência pancreática			Íleo meconial		
	Magreza + Magreza acentuada	Outros	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total	Sim	Não	Total
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>																		
CC + GC	5	23	28	5	23	28	9	19	28	2	26	28	27	1	28	5	23	28
GG	6	32	38	7	31	38	5	33	38	7	31	38	37	1	38	7	31	38
Total	11	55	66	12	54	66	14	52	66	9	57	66	64	2	66	12	54	66
p	1,0			1,0			0,075			0,282			1,0			1,0		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>																		
CC + CT	6	28	34	8	26	34	10	24	34	5	29	34	32	2	34	10	24	34
TT	4	25	29	2	27	29	3	26	29	4	25	29	29	0	29	2	27	29
Total	10	53	63	10	53	63	13	50	63	9	54	63	61	2	63	12	51	63
p	0,741			0,092			0,116			1,0			0,495			0,028*		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>																		
CC	3	16	19	2	17	19	4	15	19	4	15	19	18	1	19	4	15	19
CT	2	17	19	3	16	19	3	16	19	2	17	19	18	1	19	3	16	19
TT	3	16	19	2	17	19	4	15	19	3	16	19	19	0	19	2	17	19
Total	8	49	57	7	50	57	11	46	57	9	48	57	55	2	57	9	48	57
p	0,859			0,854			0,891			0,669			0,436			0,669		

IMC= Índice de Massa Corpórea; COX2= Cyclo-oxigenase 2; IFRD1= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina. *O polimorfismo 8473T>C no gene *COX2* apresentou valor de p significativo em associação a íleo meconial.

Tabela 14. Associação dos polimorfismos estudados com a presença de *P. aeruginosa* mucoide e não mucoide e *S. aureus* em pacientes com fibrose cística com as duas mutações *CFTR* identificadas.

Genótipo	Primeira <i>P. aeruginosa</i> isolada			<i>P. aeruginosa</i> mucoide		<i>P. aeruginosa</i> não mucoide				<i>S. aureus</i>		
	≤ 31 meses	> 31 meses	Total	Negativa	Positiva	Total	Negativa	Positiva	Total	Negativa	Positiva	Total
Polimorfismo -765G>C no gene <i>COX2</i>												
CC + GC	14	9	23	19	9	28	11	17	28	6	22	28
GG	22	19	34	17	21	38	13	25	38	7	31	38
Total	36	21	57	36	30	66	24	42	66	13	53	66
p	0,787			0,082			0,797			0,765		
Polimorfismo 8473T>C no gene <i>COX2</i>												
CC + CT	17	11	28	20	14	34	14	20	34	7	27	34
TT	17	9	26	15	14	29	9	20	29	5	24	29
Total	34	20	54	35	28	63	23	40	63	12	51	63
p	0,783			0,618			0,442			1,0		
Polimorfismo 57460C>T no gene <i>IFRD1</i>												
CC	10	6	16	10	9	19	6	13	19	5	14	19
CT	7	8	15	13	6	19	8	11	19	3	16	19
TT	11	6	17	10	9	19	7	12	19	3	16	19
Total	28	20	48	33	24	57	21	36	57	11	46	57
p	0,541			0,517			0,797			0,647		

COX2= Cyclo-oxygenase 2; *IFRD1*= Interferon-Related Developmental Regulator 1; C= citosina; T= timina ; G= guanina.

Nas **tabelas 15, 16 e 17** estão descritas as associações dos polimorfismos -765G>C, 8473T>C e 57460C>T com a saturação de O₂, os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos através de espirometria. Nenhum dado analisado mostrou associação estatisticamente significativa.

Tabela 15. Associação do polimorfismo -765G>C no gene *COX2* com a saturação de O₂, os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores obtidos no exame de espirometria.

		n	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior	Mínimo	Máximo	p
SaO₂	GC+CC	43	95.67	2.732	0.417	94.83	96.52	87	99	0,930
	GG	59	95.58	4.610	0.600	94.38	96.78	66	99	
Bhalla	GC+CC	28	7.68	4.530	0.856	5.92	9.44	0	23	0,204
	GG	45	8.40	4.271	0.637	7.12	9.68	0	23	
Kanga	GC+CC	35	18.40	5.797	0.980	16.41	20.39	11	33	0,338
	GG	54	18.33	5.667	0.771	16.79	19.88	10	40	
SK	GC+CC	37	69.32	13.651	2.244	64.77	73.88	40	90	0,357
	GG	53	67.92	14.493	1.991	63.93	71.92	20	90	
CVFA	GC+CC	30	83.33	20.924	3.820	75.52	91.15	55	135	0,649
	GG	41	81.37	20.892	3.263	74.77	87.96	29	128	
VEF1A	GC+CC	30	76.60	22.791	4.161	68.09	85.11	36	132	0,413
	GG	40	73.30	24.673	3.901	65.41	81.19	19	125	
VEF1/CVF	GC+CC	30	82.57	13.781	2.516	77.42	87.71	37	99	0,887
	GG	40	83.88	12.841	2.030	79.77	87.98	56	102	
FEF25- 75%	GC+CC	30	58.53	26.889	4.909	48.49	68.57	13	114	0,708
	GG	40	62.95	35.166	5.560	51.70	74.20	8	138	

Tabela 16. Associação do polimorfismo 8473C>T no gene *COX2* com a saturação de O₂, os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos no exame de espirometria.

		n	Média	Desvio	Erro	Limite	Limite	Mínimo	Máximo	p
SaO₂	CC+CT	57	95,09	4,669	0,618	93,85	96,33	66	99	0,609
	TT	41	96,12	2,600	0,406	95,30	96,94	86	99	
Bhalla	CC+CT	43	7,86	4,647	0,709	6,43	9,29	0	23	0,897
	TT	28	8,21	4,237	0,801	6,57	9,86	0	22	
Kanga	CC+CT	50	18,92	5,969	0,844	17,22	20,62	11	36	0,853
	TT	38	17,55	5,300	0,860	15,81	19,29	10	40	
SK	CC+CT	49	68,16	12,978	1,854	64,44	71,89	40	95	0,936
	TT	39	68,46	15,901	2,546	63,31	73,62	20	90	
CVFA	CC+CT	40	83,28	22,647	3,581	76,03	90,52	29	135	0,932
	TT	27	80,56	19,348	3,723	72,90	88,21	41	111	
VEF1A	CC+CT	39	76,08	24,614	3,941	68,10	84,06	19	132	0,773
	TT	27	73,59	23,585	4,539	64,26	82,92	27	114	
VEF1/CVF	CC+CT	39	83,72	15,941	2,553	78,55	88,89	37	137	1
	TT	27	85,33	12,153	2,339	80,53	90,14	59	102	
FEF25-75%	CC+CT	39	59,00	29,075	4,656	49,57	68,43	8	122	0,882
	TT	27	64,63	33,831	6,511	51,25	78,01	11	134	

Tabela 17. Associação do polimorfismo 57460C>T no gene *COX2* com a saturação de O₂, os escores de Bhalla, Kanga e SK e os valores de obtidos no exame de espirometria.

		n	Média	Desvio	Erro	Limite	Limite	Mínimo	Máximo	p
SaO₂	CC	28	94.54	6.173	1.167	92.14	96.93	66	98	0,753
	CT	34	95.79	2.544	0.436	94.91	96.68	87	99	
	TT	25	96.08	2.871	0.574	94.89	97.27	86	99	
Bhalla	CC	21	9.76	3.590	0.783	8.13	11.40	6	23	0,185
	CT	22	7.23	4.503	0.960	5.23	9.22	0	23	
	TT	19	7.74	5.496	1.261	5.09	10.39	0	22	
Kanga	CC	26	18.46	5.770	1.132	16.13	20.79	10	36	0,855
	CT	30	17.97	5.512	1.006	15.91	20.02	11	33	
	TT	22	18.64	6.730	1.435	15.65	21.62	12	40	
SK	CC	26	66.92	12.496	2.451	61.88	71.97	40	85	0,384
	CT	28	68.75	13.026	2.462	63.70	73.80	40	90	
	TT	24	67.92	17.871	3.648	60.37	75.46	20	90	
CVFA	CC	22	72.09	17.318	3.692	64.41	79.77	29	105	0,165
	CT	22	87.18	18.887	4.027	78.81	95.56	58	131	
	TT	16	84.38	24.055	6.014	71.56	97.19	41	135	
VEF1A	CC	22	65.36	20.127	4.291	56.44	74.29	19	114	0,142
	CT	21	78.67	24.836	5.420	67.36	89.97	36	132	
	TT	16	75.19	22.013	5.503	63.46	86.92	27	100	
VEF1/CVF	CC	22	81.95	16.114	3.436	74.81	89.10	37	102	0,933
	CT	21	83.90	11.291	2.464	78.77	89.04	58	99	
	TT	16	84.31	11.780	2.945	78.04	90.59	59	99	
FEF25-75%	CC	22	53.09	31.355	6.685	39.19	66.99	8	134	0,376
	CT	21	63.57	33.817	7.379	48.18	78.96	13	121	
	TT	16	60.44	23.639	5.910	47.84	73.03	11	88	

O resumo das características e dados clínicos da casuística é apresentado na **tabela**

18.

Tabela 18. Resumo dos dados obtidos através da análise clínica dos 103 pacientes

que compõem a casuística deste estudo.

Sexo - masculino	47.2%
Caucasoides	94.3%
Idade	156.99 ± 10.62 meses
IMC – magreza e magreza acentuada	15.1%
Uma mutação de classe I, II ou III	36.79%
Duas mutações de classes I, II e III	62.26%
Primeira manifestação clínica	8.59 ± 2.57 meses (0 – 228 meses)
Idade do diagnóstico	36.98 ± 6.73 meses (0 – 379 meses)
Primeiros sintomas digestivos	15.53 ± 4.43 meses (0 – 381 meses)
Primeiros sintomas respiratórios	14.43 ± 3.18 meses (0 – 228 meses)
Saturação transcutânea de O ₂	95.64 ± 0.378 (66 – 99)
Score de Bhalla	7.65 ± 0.503 (0 – 23)
Score de Kanga	18.25 ± 0.586 (10 – 40)
Score de Shwachman-Kulczycki	68.82 ± 1.465 (20 – 95)
FVC (%)	82.49 ± 2.14 (29 – 135)
FEV ₁ (%)	75.32 ± 2.79 (19 – 132)
FEV ₁ /FVC (%)	84.21 ± 1.71 (37 – 137)
FEF ₂₅₋₇₅ %	62.32 ± 3.80 (8 – 138)
Polipose nasal	17.9%
Diabetes mellitus	18.9%
Osteoporose	13.2%
Insuficiência pancreática	94.3%
Íleo meconial	18.9%
Primeira <i>P. aeruginosa</i> isolada	51.20 ± 7.64 meses (2 – 383 meses)
Colonização por <i>P. aeruginosa</i>	61.3%
Colonização por <i>P. aeruginosa</i> mucoide	47.2%
Colonização por <i>B. cepacia</i> status	18.9%
Colonização por <i>A. xylosoxidans</i>	14.2%
Colonização por <i>S. aureus</i>	80.2%

V - Discussão

Genes modificadores

As mais de 1.900 mutações que podem ocorrer no gene *CFTR* são responsáveis pela FC, uma doença monogênica cuja apresentação clínica é muito variável entre os pacientes. Seria esperado que as mutações no gene *CFTR* determinassem a gravidade da FC, porém tal fato não é observado na prática, principalmente em relação ao quadro pulmonar. Pacientes com mutações das classes I, II e III apresentam formas clínicas mais graves que aqueles com mutações das classes IV, V e VI. Contudo, é possível observar variações clínicas nos pacientes com mutações idênticas no gene *CFTR*, mostrando que outros fatores são capazes de modular o curso clínico da enfermidade.

A evolução da FC é resultado da interação entre o genótipo do indivíduo e o meio ambiente. Poucos estudos têm correlacionado mutações, polimorfismos e variáveis clínicas na FC (68). Este fato é associado à dificuldade em obter tamanho amostral suficiente para as numerosas mutações, conseguir tratamento homogêneo aos pacientes e caracterizar o *followup* da doença pulmonar crônica e persistente.

O principal fator ambiental na variabilidade clínica da FC é o acesso ao tratamento (69). No nosso centro de referência (HC/Unicamp), o tratamento é garantido pelo sistema público de saúde, o que possibilita acesso igualitário a todos pacientes incluídos na pesquisa, e não concerne como fator adicional ponderável a análise de viés para as análises estatísticas.

Os genes modificadores são fatores secundários ao desenvolvimento da FC. São genes relacionados a canais iônicos alternativos que podem de alguma forma interferir no transporte de cloreto através da membrana apical celular. Grande parte dos estudos atuais têm concentrado esforços em genes que controlam e regulam o sistema imune, uma vez que, a infecção bacteriana crônica nas vias aeríferas é responsável pela doença pulmonar

crônica que acomete mais de 90% dos pacientes com FC e é a maior causa de mortalidade de pacientes com a desordem (70).

No atual estudo foram selecionados três polimorfismos, nos genes *COX2* e *IFRD1* cuja expressão está relacionada à articulação do sistema imune. A busca por polimorfismos e associação com o quadro clínico dos pacientes pode prover pistas a respeito da capacidade modulatória exercida pelos supostos gene modificadores e intervenções terapêuticas que podem ser realizadas.

Gene *COX2*

A enzima ciclo-oxigenase 2 produto do gene *COX2* cuja função é relacionada a processos inflamatórios teve polimorfismos associados a gravidade da FC. Tal enzima participa de uma via de síntese de mediadores responsáveis pela regulação da resposta inflamatória.

Os polimorfismos -765G>C e 8473T>C no gene *COX2* foram relatados em estudo como moduladores de gravidade de FC (51). Outros estudos apontam tais polimorfismos como associados ao aumento no risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer como o colorretal e sarcoidose (58, 54, 71, 72).

Lopez-Campos e colaboradores constataram que portadores do genótipo CC para o polimorfismo 8473T>C apresentavam maior risco de desenvolver sarcoidose comparado aos indivíduos homozigotos TT, sendo que não foram encontradas associações entre tal polimorfismo e o prognóstico da doença (58).

Outros estudos apontaram a ação dos polimorfismos no *COX2* no desenvolvimento de câncer colorretal, um processo multigênico e complexo, doença na qual a inflamação crônica é relacionada à neoplasia colorretal (73). Para o polimorfismo -765G>C, indivíduos

cujos genótipos GG mostraram menor risco de desenvolver câncer comparado aos genótipos CC+GC, entretanto existem divergências. Recentemente foi apontado que tal efeito protetor é verificado em população asiática, mas não em população caucasóide, contrariando muitos estudos, sugerindo possível papel das diferenças étnicas encontradas entre os grupos populacionais (54). Embora exista divergência, estudos apontam que polimorfismos na sequência promotora do *COX2* são capazes de modular a expressão gênica e consequentemente alterar a ação do sistema imune do indivíduo em processos inflamatórios ou carcinogênicos (51, 74).

Em relação à FC, uma hipótese é de que elevados níveis de *COX2* podem ter um impacto negativo no curso e gravidade da doença devido à intensa produção de prostaglandina o que leva à intensificação da resposta inflamatória. Processos inflamatórios são uma das principais causas que levam à rápida deterioração das vias aéreas nos pacientes com FC. Baseado nisso, a diminuição na concentração de *COX2* ativa pode estar relacionada a processo inflamatório menos intenso já que a síntese de prostaglandinas está reduzida; consequentemente os danos pulmonares seriam menores mediante a presença das variantes alélicas -765C e 8473C (50, 75).

Os polimorfismos -765G>C e 8473T>C foram associados à modificação da FC por Czerska e colaboradores em 2010, pioneiros nesse estudo de acordo com os achados na literatura. A análise foi composta por 94 pacientes poloneses com idade de 2 a 34 anos e genótipo F508del em seguimento em um mesmo centro para evitar que diferenças em relação ao tratamento pudessem influenciar o resultado do trabalho. Entre diversos polimorfismos analisados, as variantes -765G>C e 8473T>C foram aquelas que foram associadas à diminuição na concentração proteica uma vez que tais variáveis levam à redução na expressão ou redução do RNAm antes que ele seja traduzido. O estudo

constatou que os genótipos heterozigotos estavam associados ao melhor curso clínico, evidenciando que os genótipos -765C e 8473C estavam significativamente associados a maiores valores de FEV₁% e infecções por *P. aeruginosa* menos frequentes. Porém tal associação não foi encontrada em todas as faixas etárias, o que pode ser reflexo do efeito crônico, progressivo e dependente da idade que ocorre na FC (50).

No presente estudo, os genótipos do polimorfismo -765G>C tiveram suas distribuições fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que poderia indicar um genótipo associado a uma variação clínica. No entanto ao analisar as variáveis, não foi encontrada associação com esse polimorfismo.

A associação encontrada neste estudo foi entre o polimorfismo 8473T>C com relação à presença de polipose nasal na amostra geral e a presença de íleo meconial na amostra onde as duas mutações *CFTR* foram isoladas. Tais associações foram de proteção, ou seja, indivíduos TT teriam menor risco de apresentar polipose nasal ou íleo meconial. Essa última associação não foi presente na amostra geral. Portanto, é possível que seja uma associação espúria, devido à diminuição do tamanho amostral.

Tal achado contradiz diversos estudos encontrados na literatura, uma vez que eles apontam que o genótipo CC deveria apresentar resposta inflamatória reduzida, o que contribuiria para a não ocorrência de processos inflamatórios. Polipose nasal é o prolapso da mucosa nasal decorrente do processo inflamatório crônico da mucosa respiratória nasal e dos seios paranasais, caracterizado pela presença de pólipos nasais múltiplos (76). Considerando que um processo inflamatório leva à ocorrência da polipose, esperar-se-ia que alterações nos genes de resposta inflamatória alterassem a probabilidade de desenvolvimento de tal comorbidade. Os achados deste trabalho indicam que a presença do alelo selvagem T, que promoveria maior expressão da enzima COX2 em relação ao

genótipo 8473C, apresenta efeito protetor em relação ao desenvolvimento da polipose nasal. Vale ressaltar que não foram encontrados artigos indicando ou elucidando o papel da COX2 na ocorrência da polipose nasal, portanto, fazem-se necessários estudos mais aprofundados e replicação em outras amostras para averiguar a ação do polimorfismo em relação a este achado clínico.

Íleo meconial é a manifestação mais precoce da FC e ocorre em cerca de 20% dos pacientes com esta enfermidade. Tal condição clínica é caracterizada pelo mecônio viscoso e adesivo que encontra dificuldade em atravessar o íleo. Estudos atuais apontam que o desenvolvimento da doença pulmonar, deficiências nutricionais e mortalidade em pacientes que apresentaram íleo meconial comparado àqueles que não apresentaram não apresentam diferenças significativas (77, 78, 79). O mecanismo pelo qual o genótipo TT do polimorfismo 8473T>C teria um efeito protetor não é conhecido, mas poderíamos inferir se essa associação não seria indireta, e na verdade haja um mecanismo primário a ser elucidado.

Gene *IFRD1*

A IFRD1 é uma proteína expressa em neutrófilos maduros e capaz de interagir com a enzima histona desacetilase, modelando a diferenciação celular e o estresse oxidativo. Uma vez que, a doença pulmonar na FC é caracterizada pela inflamação neutrofílica e estresse oxidativo, a ação da IFRD1 pode exercer um papel chave na regulação na inflamação nas vias aeríferas dos pacientes.

O estudo de Blanchard e colaboradores relata que a expressão e funcionalidade da IFRD1 não são restritas a neutrófilos, mas que pode também regular a inflamação nas vias aeríferas através da expressão de IFRD1 em células epiteliais destes órgãos, um tipo celular

com papel chave na fisiopatogenia da doença pulmonar em pacientes com FC. Entretanto, maiores conclusões ainda não foram elucidadas, tornando necessários mais estudos comparando a expressão e regulação da IFRD1 em diferentes tipos celulares para compreender o complexo desenvolvimento da doença pulmonar.

Recentes estudos de Hector e colaboradores identificaram dois polimorfismos (rs11771128 e rs4727770) no gene *IFRD1* associados à modulação da FC. Pacientes heterozigotos para tais polimorfismos apresentavam maiores níveis de IFRD1 em neutrófilos da corrente sanguínea, comparado a indivíduos homozigotos. Porém, o modo como tal expressão diferencial influencia e rege o sistema de defesa ainda não foi bem esclarecido. A compreensão da expressão e regulação da IFRD1 em neutrófilos pode trilhar novas abordagens terapêuticas.

Ehrnhoefer demonstrou também que a proteína IFRD1 medeia uma co-repressão transcricional pela interação com a histona desacetilase, enzima esta que tem sido implicada na diferenciação celular e na resposta ao estresse (62).

Em 2009, Gu e colaboradores descreveram a importância da proteína IFRD1 na FC, uma vez que ela atuaria na regulação da função efetora dos neutrófilos, processo este importante no processo inflamatório, base da fisiopatogenia da manifestação pulmonar da FC. Ao realizar uma análise por *array* em 320 pacientes com FC divididos em dois grupos segundo a severidade do quadro clínico, verificou-se que mutações no gene dessa proteína poderiam funcionar como moduladoras de gravidade na FC (61).

Apesar de outros estudos terem encontrado relação com o genótipo do polimorfismo 57460C do gene *IFRD1* e a gravidade do quadro pulmonar, em nosso estudo não foi encontrada associação entre os genótipos desse polimorfismo e a idade de início dos sintomas, do diagnóstico e a presença de sintomas pulmonares, bem como com a presença

da *P. aeruginosa* e *S.aureus*. Se realmente esse polimorfismo modulasse a gravidade da doença, esperar-se-ia uma alteração nessas variáveis, frente ao papel dessa proteína no processo inflamatório, processo este intimamente ligado à colonização/infecção bacteriana nos pacientes com FC. Com isso esperar-se-ia que nos genótipos mutantes encontraríamos um início precoce da doença e maior presença das bactérias, com consequente pior evolução do quadro pulmonar desses pacientes. Uma vez que o homozigoto mutante teve uma prevalência de 28% em nossa amostra, não podemos ao menos sugerir que haveria uma baixa proporção desse alelo em nossa população e devido a isso não haveria modulação em nossos pacientes. Só nos resta deduzir, pelos nossos resultados, que esse polimorfismo não teria um efeito modulador.

Era esperado que pacientes com menor expressão da proteína condicionada pelos polimorfismos analisados tivessem início precoce da doença pulmonar. O pulmão é o órgão que apresenta maior influência do ambiente na gravidade clínica da FC, e a atuação de genes responsivos a essa influência podem atuar de forma direta e indireta à clínica, postergando o início da doença pulmonar, favorecendo a melhor evolução clínica e reduzindo a morbimortalidade associada à doença pulmonar.

A doença pulmonar na FC é influenciada por múltiplos fatores, dentre eles, o ambiente e genes associados à resposta ambiental (68). Atualmente existem relatos na literatura com o intuito de promover a terapia gênica para a FC, porém existem diversos problemas associados e a resposta ainda é reduzida e/ou inefetiva (80).

Estudos devem continuar na procura de genes modificadores do quadro pulmonar da FC e que no futuro possibilitem encontrar alvos para terapias que melhorem a evolução pulmonar da doença e com isso a morbimortalidade.

Um dos maiores desafios na procura por genes modificadores e na averiguação da suposta ação modulatória exercida por eles é a caracterização do fenótipo do paciente. Para algumas características como insuficiência pancreática e íleo meconial a caracterização é simples e a classificação pode ser binária, classificando apenas como “positivo” ou “negativo”. Porém, a caracterização do quadro pulmonar ainda exige grande atenção: mesmo que o FEV1 seja um bom indicador da doença pulmonar, é importante que um bom levantamento clínico tenha sido realizado. Alguns trabalhos de outros grupos relatados na literatura criaram e utilizaram escores próprios para averiguar o quadro pulmonar, o que pode ter interferido na comparação dos resultados do nosso estudo com a validação de outros grupos. Diferentes formas de realizar a avaliação clínica podem levar a diferenças encontradas entre estudos realizados por centros de estudos e populações distintas.

Outro ponto que deve ser discutido é que a contradição encontrada nesse estudo pode ser devido a fatores não herdáveis que atuam de modo diferente em centros distintos, assim como entre pacientes de diferentes populações. O aumento na expectativa de vida entre os pacientes nas últimas décadas é enorme comparado a outras doenças, mostrando que melhor medicação e cuidados terapêuticos alteram dramaticamente o ambiente no qual o paciente está inserido. Como consequência, alguns estudos podem não ter grande poder de detectar o desequilíbrio alélico se a frequência do alelo de risco na população FC é reduzida devido ao efeito na sobrevivência, principalmente em populações mais velhas. Descrever genes modificadores na FC permanece um desafio mesmo que a doença seja monogênica por definição.

Na literatura é possível encontrar divergências em relação ao poder modulador dos genes modificadores. Genes identificados como modificadores por um estudo anterior não

são validados em uma análise similar em uma população distinta em um estudo subsequente. Como exemplo o gene *MBL2* foi muito testado já que possui um papel importante da defesa inata do organismo e pacientes com deficiência nesse gene tem maior predisposição à infecção por bactérias e vírus. Alguns estudos encontraram tal gene associado a um pior quadro pulmonar enquanto outros mostraram a infecção precoce por *P. aeruginosa* (81-84). Mesmo com diversos resultados positivos, outros estudos não encontraram tal associação, o que pode refletir, por exemplo, em diferenças na caracterização clínica, na idade dos pacientes e outros fatores relacionados a infecção bacteriana (17). Genes modificadores têm sido estudados desde 1999 e entre diversos resultados positivos, achados negativos são constantemente contraditos por outros estudos isolados. A identificação de genes candidatos a modificadores ainda é uma barreira devido ao incompleto entendimento da fisiopatologia da doença pulmonar da FC. Para confirmação da ação é crítico que haja a replicação da associação em uma população separada, e de preferência várias vezes.

A habilidade de conduzir estudos sem viés e localizar polimorfismos no genoma inteiro tem custo alto. Para maximizar o poder de identificação e confiabilidade, alguns grupos de estudos se uniram e criaram um consórcio com mais de 3500 pacientes com fenótipos muito bem estabelecidos. A habilidade de identificar genes ou regiões gênicas que influenciem o curso da doença sustenta várias promessas para um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos e para a manipulação dos genes para ganho terapêutico. Um grande embargo dessas pesquisas é que elas podem identificar diversos genes, mas apenas como marcadores. Infelizmente os estudos ainda não fornecem informações sobre os mecanismos segundo os quais as variantes exercem seus efeitos fenotípicos. E mesmo

assim, posteriormente é necessário que os genes passem por estudos funcionais para terem utilidade clínica; o potencial de aplicação clínica está muito próximo.

No presente estudo não foi possível replicar os achados encontrados na literatura realizada em populações europeias. É possível que diferentes e conflitantes padrões de associação dos polimorfismos e o fenótipo sejam explicados por tendências geográficas e polimorfismos típicos de determinadas regiões globais, bem como diferentes modos de caracterização clínica e tratamento recebido.

VI - Conclusões

Da análise de nossa amostra concluímos que:

- A frequência dos polimorfismos -765C e 8473C no gene *COX2* foram de 0,22 e 0,33 respectivamente.
- A frequência do polimorfismo 57460T no gene *IFRD1* foi de 0,48.
- Foi observada associação entre o polimorfismo 8473T>C, ocorrendo um efeito protetor com relação ao genótipo TT e a presença de polipose nasal.
- Foi observada associação entre o polimorfismo 8473T>C, entre pacientes com as duas mutações *CFTR* identificadas, ocorrendo um efeito protetor com relação ao genótipo TT e a presença de íleo meconial.

VII – Referências Bibliográficas

- [1] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989 Sep;245(4922):1066-73.
- [2] Collins, FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 1992 May;256(5058):774-9.
- [3] Devlin, TM. Manual de bioquímica com correlação clínica, 4ªed., São Paulo, SP: Ed. Edgar Blucher LTDA; 1998.
- [4] Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. 1991 Jul;253(5016):202-5.
- [5] <http://www.genet.sickkids.on.ca>
- [6] Slieker MG, Sanders EAM, Rijkers GT, Ruven HJT, van der Ent CK. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005 Aug;4 Suppl 2:7-13.
- [7] Welsh M, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver AB, Sly WS, Vall D, cds. *The molecular and metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 2001;5121-88.
- [8] Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67(2);117-33.
- [9] Correia, Cyntia Arivabeni de Araujo. Prevalência de seis mutações no gene CFTR em portadores de fibrose cística da região de Campinas [Dissertação]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- [10] Bieger AM, Marson FAL, Bertuzzo CS. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. *J Pediatr (Rio J)*. 2012 Nov;88(6):531-4.
- [11] Bachhuber T, König J, Voelcker T, Mürle B, Schreiber R, Kunzelmann K. Cl⁻ interference with the epithelial Na⁺ channel ENaC. *J Biol Chem*. 2005 Sep;280(36):31587-94.
- [12] Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78(2):171-86.
- [13] Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Cl North Am*. 2000 May;84(3):597-607.
- [14] Hull J. Basic science of cystic fibrosis. *Current Paediatr*. 2003 Aug;13(4):253-58.
- [15] De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tümmler B et al. Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating ussing chambers. *J Cyst Fibros* 2004 Aug;3 Suppl 2:159-63.

- [16] Alvarez AE. Análise clínica e laboratorial de 104 pacientes, com Fibrose Cística, do ambulatório de pediatria da Unicamp, na última década do século XX, com o genótipo e a gravidade da doença [Dissertação]. Campinas: (SP) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2002.
- [17] Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec 1;2(12).
- [18] Clunes MT, Boucher, RC. Cystic Fibrosis: The mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2007;4(2):63–72.
- [19] Dawson M, Wirtz D, Hanes J. Enhanced viscoelasticity of human cystic fibrotic sputum correlates with increasing microheterogeneity in particle transport. *J Biol Chem* 2003 Dec;278(50):50393–401.
- [20] Rubin BK. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2007 Mar;8(1):4–7.
- [21] Kerem E, Corey M, Gold R, Levison H. Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pediatr*. 1990 May;116(5):714–19.
- [22] Weber SAT, Ferrari GF. Incidência e evolução da polipose nasal em crianças e adolescentes com fibrose cística. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008 Feb;74(1):16-20.
- [23] Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:475-82.
- [24] Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med*. 2007 Jun;28(2):279-88.
- [25] Feuillet-Fieux MN, Ferrec M, Gigarel N, Thuillier L, Sermet I, Steffan J, et al. Novel cftr mutations in black cystic fibrosis patients. *Clin Genet* 2004 Apr; 65(4):284-7.
- [26] Rodrigues R. Estudo piloto para a implantação da triagem da fibrose cística no Estado de São Paulo [Dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2008.
- [27] Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 2007 Mar;29(3):522–6.
- [28] Wolfenden LL, Schechter MS. Genetic and non-genetic determinants of outcomes in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2009 Mar;10(1):32-6.
- [29] Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absent of CFTR mutations. *N Engl J Med*. 2002 Aug;347(6):401- 42.
- [30] Bronsveld I, Mekus F, Bijman J et al. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 2001 Dec;108(11):1705-15.

- [31] Accurso FJ, Sontag MK. Gene modifiers in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):839-41.
- [32] Knowles MR. Gene modifiers of lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2006 Nov;12(6):416-21.
- [33] Merlo CA, Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med*. 2003 Apr;141(4):237-41.
- [34] Boyle MP. Strategies for identifying modifier genes in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jan;4(1):52-7.
- [35] Davies JC, Griensenbach U, Alton E. Modifiers genes in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 2005 May;39:383-391.
- [36] Grasemann H, Buscher R. Disease modifying genes in cystic fibrosis: therapeutic option or one-way road? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006 Nov;374(2):65–77.
- [37] Zheng S, De BP, Choudhary S, Comhair SA, Goggans T, Slee R et al. Impaired innate host defense causes susceptibility to respiratory virus infections in cystic fibrosis. *Immunity*. 2003 May;18(5):619–30.
- [38] Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):309–12.
- [39] Proesmans M, Vermeulen F, De Boeck K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr*. 2008 Aug;167(8):839-49.
- [40] Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:69–102.
- [41] DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998 Sep;12(19):1063–73.
- [42] Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(12):1491–95.
- [43] Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR. Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem*. 1992 Mar;267(7):4338–44.
- [44] Pisetsky DS, St Clair EW. Progress in the treatment of rheumatoid arthritis. *JAMA*. 2001 Dec;286(22):2787–90.
- [45] Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*. 1999 Jun;5(6):698–701.
- [46] Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997 Apr;34(5):391–9.

- [47] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998 Oct;102(7):1369–76.
- [48] Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J*. 1994 Sep;302:723–7.
- [49] Tazawa R, Xu XM, Wu KK, Wang LH. Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Aug;203(1):190–9.
- [50] Czerska K, Sobczynska-Tomaszewska A, Sands D, Nowakowska A, Bak D, Wertheim K et al. Prostaglandin-endoperoxide synthase genes COX1 and COX2 - novel modifiers of disease severity in cystic fibrosis patients. *J Appl Genet*. 2010;51(3):323-30.
- [51] Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Oct;22(10):1631-6.
- [52] Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene*. 1999 Oct 1;238(2):291-300.
- [53] Wu Y, Ruef J, Rao GN, Patterson C, Runge MS. Differential transcriptional regulation of the human thrombin receptor gene by the Sp family of transcription factors in human endothelial cells. *Biochem J*. 1998 Mar;330(Pt 3):1469-74.
- [54] Cao H, Xu Z, Long H, Li XQ, Li SL. The -765C allele of the cyclooxygenase-2 gene as a potential risk factor of colorectal cancer: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med*. 2010 Sep;222(1):15-21.
- [55] Fritsche E, Baek SJ, King LM, Zeldin DC, Eling TE, Bell DA. Functional characterization of cyclooxygenase-2 polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Nov;299(2):468-76.
- [56] Cok SJ, Morrison AR. The 3-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem* 2001 Jun;276:23179–85.
- [57] Sorensen M, Autrup H, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. A genetic polymorphism in prostaglandin synthase 2 (8473, T→C) and the risk of lung cancer. *Cancer Lett*. 2005 Aug;226(1):49-54.
- [58] Lopez-Campos JL, Rodriguez-Rodriguez D, Rodriguez-Becerra E, Michavila IA, Guerra JF, Hernandez FJG et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms confer susceptibility to sarcoidosis but are not related to prognosis. *Respir Med*. 2009 Mar;103(3):427-33.

- [59] Mandal RK, Mittal RD. Polymorphisms in COX-2 gene influence prostate cancer susceptibility in a northern Indian cohort. *Arch Med Res*. 2011 Oct;42(7):620-6.
- [60] Buanne P, Incerti B, Guardavaccaro D, Avvantaggiato V, Simeone A, Tirone F. Cloning of the human interferon-related developmental regulator (IFRD1) gene coding for the PC4 protein, a member of a novel family of developmentally regulated genes. *Genomics*. 1998 Jul 15;51(2):233-42.
- [61] Gu YY, Harley ITW, Henderson LB, Aronow BJ, Vietor I, Huber LA et al. Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature*. 2009 Apr;458(7241):1039-42.
- [62] Ehrnhoefer DE. IFRD1 modulates disease severity in cystic fibrosis through the regulation of neutrophil effector function. *Clin Genet*. 2009 Aug;76(2):148-9.
- [63] Vadivelu SK, Kurzbauer R, Dieplinger B, Zweyer M, Schafer R, Wernig A et al. Muscle regeneration and myogenic differentiation defects in mice lacking TIS7. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(8):3514-25. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2005 Dec;25(24):11194.
- [64] Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*. 1990 Nov;323(22):1517-22.
- [65] Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J Pediatr (Rio J)*. 2004 Sep-Oct;80(5):371-9.
- [66] Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A, 2004. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114:248-253.
- [67] Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A, 2005. Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandin production in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:221-223.
- [68] Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Dec;1214:57-69.
- [69] Griesse M, Busch P, Caroli D, Mertens B, Eismann C, Harari M, Staudter H, Kappler M. Rehabilitation Programs for Cystic Fibrosis - View from a CF Center. *Open Respir Med J*. 2010 Jan;4:1-8.
- [70] Hollox EJ, Davies J, Griesenbach U, Burgess J, Alton EW, Armour JA. Beta-defensin genomic copy number is not a modifier locus for cystic fibrosis. *J Negat Results Biomed*. 2005 Dec;4:9-13.
- [71] Daraei A, Salehi R, Mohamadhashem F. PTGS2 (COX2) -765G>C gene polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in Iranian population. *Mol Biol Rep*. 2012 May;39(5):5219-24.

- [72] Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Moon JH, Ryoo HM, Bae SH et al. Prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) 8473T>C polymorphism associated with prognosis for patients with colorectal cancer treated with capecitabine and oxaplatin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Oct;64(5):953-60.
- [73] Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Apr;16(2):102-6.
- [74] Wu L, Merrilees M, Young RP, Black PN. The cyclooxygenase-2 -765C promoter polymorphism protects against the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2001 Mar;105(3):506-10.
- [75] Ulrich CM, Bigler J, Sibert J, Greene EA, Sparks R, Carlson CS, Potter JD. Cyclooxygenase 1 (COX1) polymorphisms in African-American and Caucasian populations. *Hum Mutat*. 2002;20(5):409-10.
- [76] Souza BB, Serra MF, Dorgam JV, Sarreta SMC, Mello VR, Anselmo-Lima WT. Polipose nasossinusal: doença inflamatória crônica evolutiva? *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2003 Jun;69(3).
- [77] Munck A, Gerardin M, Alberti C, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg*. 2006 Sep;41(9):1556-60.
- [78] Efrati O, Nir J, Fraser D, Cohen-Cymberknoh M, Shoseyov D, Vilozni D et al. Meconium ileus in patients with cystic fibrosis is not a risk factor for clinical deterioration and survival: the Israeli Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Feb;50(2):173-8.
- [79] Johnson JA, Bush A, Buchdahl R. Does presenting with meconium ileus affect the prognosis of children with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*. 2010 Oct;45(10):951-8.
- [80] Sinn PL, Anthony RM, McCray PB Jr. Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(1):79-86.
- [81] Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: Cohort study. *Br Med J*. 1999 Oct;319:1166-67.
- [82] Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):431-7.
- [83] Dorfman R, Sandford A, Taylor C, Huang B, Frangolias D, Wang Y et al. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):1040-9.
- [84] McDougal KE, Green DM, Vanscoy LL, FallinMD, Grow M, Cheng S et al. Use of a modeling framework to evaluate the effect of a modifier gene (MBL2) on variation

in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 2010 Jun;18(6):680–4.

VIII – Anexos



CEP, 17/03/11

(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 052/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).

CAAE: 1036.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “POLIMORFISMOS -765G>C E 8473T>C NO GENE COX2 E 57460C>T NO GENE IFRD1 COMO MODIFICADORES DA GRAVIDADE DA FIBROSE CÍSTICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Aline Roberta Bariani Marcelino

INSTITUIÇÃO: Depto. de Genética Médica / FCM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/02/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 17/03/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Verificar se as variantes genéticas -765G>C E 8473>C do gene COX E 57460C>T do gene IFRD1 estão associadas ao quadro clínico de portadores de fibrose cística, em acompanhamento no ambulatório de mucoviscidoses.

III – SUMÁRIO.

Projeto de mestrado. Mutações em ambos alelos do gene CFTR resultam na manifestação da fibrose cística (FC), doença com prognóstico e severidade variável entre indivíduos com o mesmo genótipo CFTR. Os genes COX e IFRD1 foram recentemente identificados como modificadores da FC, cujas variantes podem estar associadas aos diferentes fenótipos de manifestação da doença. O presente estudo propõe estudar tais variantes e as relações com o quadro clínico da FC. Para tanto, utilizará amostras do banco de material biológico existente no lab. genética molecular, cujo regimento foi aprovado por este CEP. Os doadores assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a análise e armazenamento de seu material biológico e correspondem a indivíduos com FC acompanhados no Ambulatório de Mucoviscidoses da FCM/Unicamp. Entre estes, serão selecionados os DNAs de 100 sujeitos com valores de cloro do suor iguais ou superiores a 60mEq/L. Os polimorfismos serão estudados através de PCR e a análise estatística será feita através do programa SSPS, versão 11. Os autores solicitam dispensa da aplicação do TCLE.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP



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

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

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

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

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.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 II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de fevereiro de 2011.

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