



DANIELA TENÓRIO FURGERI

**“STUDY OF POLYMORPHISMS IN *ADRA2A* AND *TCF7L2* GENES
ASSOCIATED WITH CLINICAL GRAVITY OF CYSTIC FIBROSIS”**

**“ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TCF7L2* E *ADRA2A*
ASSOCIADOS À GRAVIDADE CLÍNICA DA FIBROSE CÍSTICA.”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIELA TENÓRIO FURGERI

**“STUDY OF POLYMORPHISMS IN *ADRA2A* AND *TCF7L2* GENES
ASSOCIATED WITH CLINICAL GRAVITY OF CYSTIC FIBROSIS”**

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

**“ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *TCF7L2* E *ADRA2A*
ASSOCIADOS À GRAVIDADE CLÍNICA DA FIBROSE CÍSTICA.”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Doctorate thesis presented to the Clinical Medicine Post-Graduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Clinical Medicine.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELA
TENÓRIO FURGERI E ORIENTADO PELA PROFA. DRA.
CARMEN SÍLVIA BERTUZZO.

Assinatura da Orientadora

.....

CAMPINAS

2013

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

F976e Furgeri, Daniela Tenório, 1983-
Estudo de polimorfismos nos genes TCF7L2 e
ADRA2A associados à gravidade clínica da fibrose
cística / Daniela Tenório Furgeri. -- Campinas, SP : [s.n.],
2013.

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

1. Genótipo. 2. Fenótipo. 3. Genes Modificadores. 4.
Diabetes Mellitus. 5. Regulador de condutância
transmembrana em fibrose cística. I. Bertuzzo, Carmen
Silvia, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study of polymorphisms in ADRA2A and TCF7L2 genes associated with clinical gravity of cystic fibrosis.

Palavras-chave em inglês:

Genotype
Phenotype
Genes, Modifier
Diabetes Mellitus
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Carmen Silvia Bertuzzo [Orientador]
Mônica Barbosa de Melo
Fábio Rossi Torres
Mithitaka Soma

Ana Lúcia Brunialti Godard

Data da defesa: 27-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANIELA TENÓRIO FURGERI

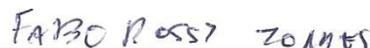
Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

MEMBROS:

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



2. PROF(A). DR(A). FÁBIO ROSSI TORRES



3. PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



4. PROF(A).DR(A). ANA LÚCIA BRUNIALTI GODARD



5. PROF(A).DR(A). MITHITAKA SOMA



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

Data: 27 de março de 2013

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas,
aos meus pais (Cácio e Maria do Carmo),
aos meus irmãos (Juliano e Renata)
e ao meu esposo Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos, meu esposo Rodrigo e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. .

À professora Carmen pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Ao amigo Fernando Lima Marson. Dizer obrigada não é o suficiente para agradecer tudo o que você me ajudou.

E a todos os meus colegas do laboratório pelo respeito, alegria e agradável convivência. Pessoas sempre cheias de energia e atitude positiva.

Aos amigos, *and you know who you are*, por participarem, e se interessarem, por torcerem e apoiarem, por inspirarem. Diariamente ou eventualmente, pessoalmente ou virtualmente, vocês tornaram o caminho menos sinuoso.

Agradeço, portanto, àqueles que ajudaram, a tornar este trabalho possível, das mais variadas formas.

A todos os que me ajudaram chegar até aqui, obrigada.

“Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência.

Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão.”

Lao Tsé

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva com características de doença complexa. Complicações clínicas parecem ser fator decisivo para o prognóstico dos pacientes. Os polimorfismos nos genes *ADRA2A* e *TCF7L2* são importantes para elucidar parte da variabilidade encontrada nas características clínicas de doenças inflamatórias, incluindo a FC, que tem a Diabetes Mellitus como uma importante co-morbidade.

Os objetivos deste estudo foram determinar a frequência do polimorfismo rs12255372 no gene *TCF7L2* e sua associação com Diabetes Mellitus em pacientes com fibrose cística, e investigar a associação de 27 variáveis clínicas da FC com os polimorfismos rs553668 e rs10885122 do gene *ADRA2A*.

Em nosso estudo, 145 pacientes foram avaliados em relação ao genótipo do polimorfismo rs12255372 no gene *TCF7L2* e 176 pacientes foram avaliados em relação a associação dos polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* com 27 variáveis clínicas da FC. Todos os pacientes em atendimento no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP foram confirmados como tendo fibrose cística por dois testes de suor alterados (valor de sódio e de cloro superior a 60 mmol / L) e por análise de diferencial do epitélio da membrana do intestino através da dosagem de *CFTR* pela câmara Ussing.

A identificação das mutações do gene *CFTR* foi realizada no laboratório de Genética Molecular da FCM/Unicamp. O rastreio do polimorfismo rs12255372 foi feito através da técnica de PCR associada à digestão enzimática específica. O rastreio dos polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* foi feito por PCR ARMS. Uma comparação genotípica foi realizada com as 27 variáveis clínicas, da FC considerando as mutações do gene *CFTR*.

Encontramos associações clínicas, sem considerar as mutações no gene *CFTR*, com as variáveis categóricas: raça [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,002$), grupo haplotípico ($p = 0,014$)], íleo Meconial [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,030$)]. Quando consideradas as duas mutações no gene *CFTR*, encontramos associações com as variáveis íleo meconial ($p = 0,0012$) e IMC [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,014$)]. A associação com dados numéricos, sem considerar as mutações no gene *CFTR*, foi positiva para a idade ao diagnóstico [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,022$)]. Considerando as duas mutações no gene *CFTR*, a associação com dados numéricos foi positiva para o Escore de Bhalla [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,014$)], Escore de Shwachman-Kulczycki [para o polimorfismo rs553668 ($p = 0,008$) e haplótipos ($p = 0,050$)]. Os polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* parecem ser moduladores da gravidade da FC em nossa amostra.

Em nossa amostra, não houve associação entre o polimorfismo rs12255372 no gene *TCF7L2* e a Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease with characteristics of complex disease. Clinical complications appear to be a decisive factor in the prognosis of patients. The *ADRA2A* and *TCF7L2* gene polymorphisms are important to elucidate part of the variability encountered in clinical characteristics in inflammatory diseases, including CF, which has diabetes-associated as an important comorbidity.

The aims of this study were to determine the frequency of polymorphism rs12255372 in the *TCF7L2* gene and its association with Diabetes Mellitus in Cystic Fibrosis patients and to investigate the association of 27 CF clinical variables with *ADRA2A* polymorphisms.

In our study, 145 patients were evaluated in relation to the genotype of the rs12255372 polymorphism in the *TCF7L2* gene. 176 patients were evaluated in relation to associate rs553668 and rs10885122 polymorphisms in the *ADRA2A* gene with 27 CF clinical variables. All patients in attendance at the Pediatric Clinic at the Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, were confirmed as having cystic fibrosis by two altered sweat tests (sodium and chlorine value greater than 60 mmol/L) and by analysis of differential membrane epithelium of the intestine by the dosage of active *CFTR* through the Ussing chamber.

The identification of *CFTR* gene mutations was performed in the laboratory of Molecular Genetics, FCM/Unicamp. The rs12255372 polymorphism was screening by PCR method associated with specific enzymatic digestion.

The rs553668 and rs10885122 polymorphisms in *ADRA2A* gene were screening by ARMS-PCR. A genotypic comparison was performed with 27 CF clinical variables, considering *CFTR* mutations.

We found clinical associations, without considering the mutations in the *CFTR* gene, with categorical variables: race [for polymorphism rs553668 ($p = 0.002$), haplotype group ($p = 0.014$)], meconium ileus [for polymorphism rs553668 ($p = 0.030$)]. Considering the two mutations in the *CFTR* gene, we find associations with categorical variables meconium ileus ($p = 0.0012$) and BMI [for polymorphism rs553668 ($p = 0.014$)]. The association with numerical data, without considering the mutations in the *CFTR* gene, was positive for age at diagnosis [for polymorphism rs553668 ($p = 0.022$)]. Considering the two mutations in the *CFTR* gene, the association with numerical data was positive for Bhalla score [for polymorphism rs553668 ($p = 0.014$)], Shwachman-Kulczycki score [for polymorphism rs553668 ($p = 0.008$) and haplotypes ($p = 0.050$)]. Polymorphisms rs553668 and rs10885122 in *ADRA2A* gene appear to be modulators of CF severity in our sample.

In our sample, there was no association between the polymorphism rs12255372 in the *TCF7L2* gene and Diabetes Mellitus.

Lista de Abreviaturas e Siglas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A	Adenina
<i>ADRA2A</i>	<i>2-Adrenergic Receptor Alpha</i>
<i>ARMS</i>	<i>Amplification Refractory Mutation System</i>
C	Citosina
<i>cAMP</i>	<i>Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate</i>
<i>CBAVD</i>	<i>Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens</i>
<i>CFF</i>	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i>
<i>CFTR</i>	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFV	Capacidade Vital Forçada
DAG	Diaciglicerol
DBH	Dopamina β-hidroxilase
dL	Decilitro
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DRFC	Diabetes Relacionada à Fibrose Cística
<i>EnaC</i>	<i>Amiloride Sensitive Epithelial Sodium Channel</i>
FAM	Frequência do Alelo Menor
FC	Fibrose Cística

FEF	Fluxo Expiratório Forçado
G	Guanina
HT	Catecolamina tirosina hidroxilase
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corporal
IP	Insuficiência Pancreática
IP3	Inositol Trifosfato
Kb	Quilobase
Kg	Quilograma
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
M	Magreza
MA	Magreza Acentuada
MBL-2	<i>Mannose-binding Lectin (protein C) 2</i>
mEq	Mili equivalentes
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mM	Milimolar
N	Número de Pacientes
NBF	<i>Nucleotide-ATP-binding folds</i>
ng	Nanograma

ORCC	<i>Outwardly Rectified Chloride Channels</i>
p	Valor do Equilíbrio de Hardy-Weinberg
PAM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide
PANM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não mucóide
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKA	Proteína quinase A
PMNs	Células polimorfonucleares
pmoL	Picomol
PN	Peso Normal
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SaO ₂	Saturação Transcutânea de Oxigênio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	Sobrepeso
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
T	Timina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TCFL2	<i>Transcription Factor 7-like 2</i>
TIR	Tripsina imunorreativa
U	Unidade
VEF1	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

WHO *World Health Organization*
 α 2-AR *Alpha-2A Adrenergic Receptor*

Tabela 1. Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros (Raskin *et al.*, 2001). 48

Tabela 2. Estimativa da Fibrose Cística em alguns países (Bobadilla *et al.*, 2002). 49

Tabela 3. Incidência de FC nos diversos grupos étnicos (Fitz-Simmons, 1993). 49

Tabela 4. Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (Dawson e Frossard, 2000). 58

Quadro 1 - Critérios para o diagnóstico da FC (Rosensteins & Cutting, 1998)..... 68

Figura 1. Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da <i>CFTR</i> (adaptado de Frizzell, 1995).	56
Figura 2. Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no éxon 10 (Adaptado de Welsh e Smith, 1993).	57
Figura 3. Esquematização celular das 5 classes de mutações na FC.....	61
Figura 4. Estrutura da proteína <i>CFTR</i> (adaptado de Rowntree e Harris, 2003).	52
Figura 5 – Funcionamento da proteína <i>CFTR</i> normal (parte superior) e alterada (parte inferior) nas glândulas sudoríparas (modificada de Tsui e Durie, 1997).	54
Figura 6 - Funcionamento da proteína <i>CFTR</i> alterada no pulmão (Lewis e Clark, 2011) ..	55
Figura 7. Fatores atuantes na apresentação clínica da FC (Marson, 2011).	75
Figura 8. Estrutura do gene <i>TCF7L2</i> . Microsatélite DG10S478 e polimorfismos rs7903146 e rs12255372 (adaptado de Prokunina-Olsson <i>et al.</i> , 2009).	79
Figura 9. Estrutura do gene <i>ADRA2A</i> . Localização dos polimorfismos rs10885122 e rs553668 (adaptado de Cerqueira, 2009).	82
Figura 10. Mecanismos propostos para a patofisiologia da DRFC (adaptado de Rana <i>et al.</i> , 2010).	89

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxv
Lista de Tabelas	xxxiii
Lista de Quadros.....	xxxv
Lista de Figuras	xxxvii
1. INTRODUÇÃO	43
1.1. Fibrose Cística	45
1.1.1. Histórico	45
1.1.2. Epidemiologia	47
1.1.3. Genética da Fibrose Cística	50
1.1.3.1. Gene <i>CFTR</i>	50
1.1.3.2. Proteína <i>CFTR</i>	51
1.1.3.2.1. Funcionamento da Proteína <i>CFTR</i>	53
1.1.3.3. Mutações Associadas à Fibrose Cística.	56
1.1.3.3.1. Classes de Mutações.....	59
1.1.4. Principais Manifestações Clínicas da Fibrose Cística.....	61
1.1.4.1. Sistema Respiratório	62
1.1.4.2. Sistema Digestivo	64
1.1.4.3. Sistema Reprodutor.....	65
1.1.5. Diagnóstico da Fibrose Cística	66
1.1.5.1. Teste do Suor.....	68
1.1.5.2. Dosagem de Tripsina Imunorreativa (TIR).....	69
1.1.5.3. Condutividade.....	70
1.1.5.4. Análise genética	71
1.1.6. Prognóstico da Fibrose Cística.....	71
1.1.7. Genes modificadores na Fibrose Cística	73
1.1.7.1. Gene <i>TCF7L2</i>	77
1.1.7.1.1. Polimorfismo no gene <i>TCF7L2</i>	79
1.1.7.2. Gene <i>ADRA2A</i>	80
1.1.7.3. Polimorfismos no gene <i>ADRA2A</i>	82
1.2. Diabetes Mellitus Relacionada à Fibrose Cística (DRFC)	83
1.2.1. Epidemiologia	83
1.2.2. Fisiopatologia.....	85
1.2.3. Causas da DRFC	87
1.2.3.1. Insulinopenia.....	87
1.2.3.2. Resistência à insulina	88
1.2.4. Principais Complicações	89

1.2.5. Diagnóstico.....	90
1.2.6. Tratamento	93
2. OBJETIVOS	95
3. ARTIGO 1 – “ASSOCIATION BETWEEN THE <i>IVS4G>T</i> MUTATION IN THE <i>TCF7L2</i> GENE AND SUSCEPTIBILITY TO DIABETES IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS.”	99
4. ARTIGO 2 – “ <i>ADRA2A</i> IS A CYSTIC FIBROSIS MODIFIER GENE.”.....	107
5. DISCUSSÃO	117
5.1. <i>TCF7L2</i>	119
5.2. <i>ADRA2A</i>	122
6. CONCLUSÃO.....	127
6.1. <i>TCF7L2</i>	129
6.2. <i>ADRA2A</i>	129
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
8. ANEXOS	163
8.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa.	165

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose Cística

1.1.1. Histórico

As informações sobre a fisiopatologia e epidemiologia da Fibrose Cística (FC) foram progressivamente conhecidas no século XX. A primeira menção quanto às características relevantes dos pacientes com FC está na própria denominação conferida pelo patologista Landsteiner em 1905 ao descrevê-la como “fibrose cística do pâncreas”, uma enfermidade do pâncreas exócrino, não envolvendo as ilhotas de Langherans (Campos *et al.*, 1996).

Landsteiner realizou a primeira descrição anatomopatológica da FC em recém-nascidos falecidos no quinto dia de vida por íleo meconial. Em 1936, Guido Fanconi e colaboradores descreveram o caso de uma criança com síndrome celíaca com alterações pancreáticas, diferentes da síndrome celíaca típica e que apresentava sintomas pulmonares e intestinais.

Em 1938, Dorothy Andersen formulou a hipótese da etiologia da doença, associou definitivamente as lesões pancreáticas às pulmonares, indicando o íleo meconial como manifestação mais precoce da doença. Assim, Andersen consolidou a FC como uma entidade clínica, autônoma, multissistêmica, com uma incidência familiar significativa e propôs uma padronização de seu tratamento, tornando a doença conhecida nos países de língua inglesa. Esta publicação é considerada um marco no estudo da FC.

Posteriormente, Farber (1945) observou o caráter anormal espesso e viscoso das secreções mucosas das várias glândulas exócrinas e notou que os pacientes com Fibrose Cística sofriam de obstrução causada por esse muco em uma série de órgãos e propôs a

hipótese de que o muco espesso era consequência de estímulo excessivo parassimpático e que a secreção anômala assim produzida era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas. Farber conferiu a designação “mucoviscidose” à doença, enfatizando o bloqueio dos ductos pancreáticos e da árvore brônquica por esta secreção anômala (Campos *et al.*, 1996).

Anderson e Hodges, em 1946, sugeriram o padrão de herança autossômico recessivo da doença. Um passo essencial para o diagnóstico foi dado em 1953, quando Di Sant'Agnes e colaboradores demonstraram o teor anormalmente elevado do íon cloreto no suor, durante uma onda de calor no verão. Subsequentemente, tais pesquisadores documentaram que os níveis de sódio e cloro no suor são elevados em todos os indivíduos com Fibrose Cística.

Em 1970, Campos e Szterling registraram grandes avanços sobre a estrutura das membranas celulares, com enfoque na dinâmica do transporte de íons por canais bioquímicos e na presença de permeases ou proteínas na estrutura bilipídica da membrana apical. Na revisão realizada por Campos e Szterling foi chamada a atenção para a hipótese sobre as bombas celulares de íons cloreto e sódio na FC (Campos *et al.*, 1996; Streit *et al.*, 2003).

Dois conjuntos de observações no início da década de 80 foram importantes para o rápido entendimento do defeito molecular ligado à FC. Primeiramente, Knowles *et al.* (1981) descreveram alterações nas propriedades elétricas do epitélio respiratório na FC, associadas a anormalidades no transporte de sódio e cloro. A seguir, Quinton e Bijman (1983) descobriram o defeito do íon cloro nas células epiteliais das glândulas sudoríparas dos pacientes fibrocísticos. Registraram altos potenciais bioelétricos em nível da membrana

devidos ao decréscimo da absorção do íon cloreto nas glândulas sudoríparas dos pacientes com FC. Essas observações determinaram um papel patogénico para o movimento de água e eletrólitos pelo epitélio e, pela primeira vez, oferecia explicação plausível tanto para o déficit de água nas secreções mucosas (responsável pela obstrução de glândulas exócrinas), quanto para a disfunção de múltiplos órgãos (Faria, 2007).

Em 1985, surge a primeira indicação da presença do gene da FC no cromossomo 7 (Wainwright *et al.*, 1985). Em 1989, foi descoberto o gene que, quando mutado, causava a FC e o defeito na proteína produzida pelo gene *CFTR*. Com base em pesquisas realizadas pelo mapeamento genético, o gene responsável pela FC foi clonado (Rommens, 1989; Riordan, 1989; Kerem *et al.*, 1989). Logo tornou-se claro que seu produto, a proteína *CFTR* era de fato um canal de cloro defeituoso localizado na membrana apical do epitélio (Bear *et al.*, 1992).

1.1.2. Epidemiologia

A FC ou mucoviscidose é a doença genética autossômica recessiva mais frequente na população de origem caucasóide, com frequência estimada em um caso em cada 2500 nascimentos (Rommens, 1989; Tzetis *et al.*, 2001). Atualmente a fibrose cística afeta mais de 30.000 crianças e adultos nos Estados Unidos e mais de 70.000 no mundo (CFF, 2012) e sua frequência varia conforme o grupo étnico em que está presente (Kerem *et al.*, 1989).

Sua incidência é de aproximadamente 1:3000 nascimentos vivos na Europa. Nos Estados Unidos a incidência é de 1:3500 e no Brasil, a incidência na região sul assemelha-se a da população caucasiana do centro da Europa, porém em outras regiões do país diminui

para 1 em cada 10.000 nascidos vivos (Tabela 1) (Assael *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1996; Raskin *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 2002).

Tabela 1. Estimativa de incidência da FC em cinco estados brasileiros (Raskin *et al.*, 2001).

Estado	Estimativa de Incidência	de Estimativa de portadores do gene da FC
RS	1: 1.587	01:20
PR	1: 6.803	01:42
SP	1: 7.358	01:43
SC	1:12.048	01:56
MG	1:20.408	1:72

A FC varia conforme a população (Tabela 2) e a origem étnica (Tabela 3), é relativamente rara em populações negras e a prevalência entre os afro-americanos é de 1/17.000 (Jorde *et al.*, 2000), enquanto que entre os negros africanos é encontrada com uma incidência estimada de 1 em cada 12.000 nascidos vivos (Feuillet-Fieux *et al.*, 2004).

Tabela 2. Estimativa da Fibrose Cística em alguns países (Bobadilla *et al.*, 2002).

País	Estimativa de Incidência	de Estimativa de portadores do gene da FC
Japão	1:100.000	1:158
Finlândia	1:25.000	1:79
Suécia	1:8.000	1:45
Suíça	1:7.700	1:44
Brasil	1:6.902	1:42
Noruega	1:4.500	1:36
Espanha	1:3.500	1:30
Alemanha	1:3.300	1:29
EUA	1:2.500	1:25
Itália	1:2.500	1:25

Tabela 3. Incidência de FC nos diversos grupos étnicos (Fitz-Simmons, 1993).

População/Origem	Incidência
Europeus	1:936
Povos Hispânicos	1:1.800
Índio Norte Americano	1:2.350
Negros Americanos	1:17.000
Africanos	1:12.000
Asiáticos	1:90.000
Aborígenes do Haváí	1:2.500

A FC está associada a uma morbidade e mortalidade em jovens adultos (Welsh *et al.*, 2001). Os fibrocísticos apresentam um tempo médio de vida de 28 anos (Accurso e Sontag, 2003).

1.1.3. Genética da Fibrose Cística

1.1.3.1. Gene *CFTR*

Em 1985, encontrou-se ligação genética entre a enzima paraoxonase e a Fibrose Cística (Eiberg *et al.* 1985). Entretanto, a localização cromossômica do gene da paraoxonase não era bem conhecida. Nesse mesmo ano encontrou-se uma forte ligação genética entre a FC e um marcador polimórfico de localização desconhecida (DOCRI-917), posteriormente localizado no cromossomo 7 (Knowlton *et al.*, 1995).

Análise de ligação utilizando um grande número de marcadores polimórficos de DNA reduziu a possível região para o locus do gene da FC a cerca de 700 Kb. Foi localizado, então, o gene da FC no braço longo do cromossomo 7, na região q31.2 (Kerem *et al.*, 1989; Riordan, 1989; Rommens, 1989).

Já que não foi encontrada nenhuma anomalia cromossômica estrutural, a clonagem posicional foi à técnica de escolha para a descoberta do gene responsável pela FC. Uma região do DNA de 250 Kb foi isolada através de uma série de experimentos de clonagem molecular que se basearam no isolamento de pequenos segmentos da região de interesse. Estes fragmentos foram purificados e testados para a presença de sequências codificadoras (Rommens, 1989; Welsh *et al.*, 2001).

Análises de sequências de DNA e estudos comparativos de sequências deduzidas de aminoácidos revelam diversas homologies com proteínas de membrana celular, daí a adoção do termo "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (*CFTR*) para o produto gênico (Riordan, 1989). A prova final da identidade e função do gene da FC foi obtida pela capacidade de restaurar o fenótipo normal em células com FC transformadas em cultura (Rich *et al.*, 1990).

Embora os marcadores mais próximos estivessem a certa distância do gene responsável pela doença, ficou claro que 90% dos cromossomos tinham um haplótipo particular (Thompson *et al.*, 2002). Este resultado é conhecido como desequilíbrio de ligação, que é definido como a associação preferencial de um gene de doença com marcadores próximos.

O locus específico do gene *CFTR* contém aproximadamente 250 quilobases de DNA genômico, organizados em 27 éxons, que codificam um RNA mensageiro de 6,5 quilobases (Kb) (Collins, 1992).

Reconhecida como uma doença autossômica recessiva em 1930, a FC tem sido considerada uma doença autossômica monogênica.

1.1.3.2. Proteína *CFTR*

O RNA mensageiro é traduzido, a partir do gene da FC, em uma proteína transmembrana de 1480 aminoácidos, com massa molecular de 168.138 dáltons, da família das proteínas ATP reguladora de transporte de íons denominada Proteína Reguladora da Condutância Iônica Transmembrana (*CFTR*) (Devlin, 1998).

A proteína *CFTR* é expressa na superfície de células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, fígado, intestino, aparelho reprodutor, glândulas salivares e sudoríparas, formando um canal de cloro (Anderson *et al.*, 1991).

A proteína *CFTR* está envolvida na regulação do ORCC, que contribuem para uma boa condução do íon cloro pelas células, e do EnaC (“Amiloride-Sensitive Epithelial Sodium Channel”) que controla a passagem do íon sódio. Sua estrutura básica está representada na figura 4, e é formada por três subunidades principais: uma porção hidrofóbica, outra hidrofílica e uma porção polar. A região hidrofóbica é formada por seis segmentos capazes de atravessar a camada lipídica dupla da membrana celular; a porção hidrofílica contém duas dobras de nucleotídeos com regiões de ligação com o ATP ("nucleotide-ATP-binding folds"- NBF's) e finalmente, o domínio polar R com sítios potenciais para fosforilação pelas proteínas quinase A e C e N-glicosilase (Riordan, 1989; Devlin, 1998).

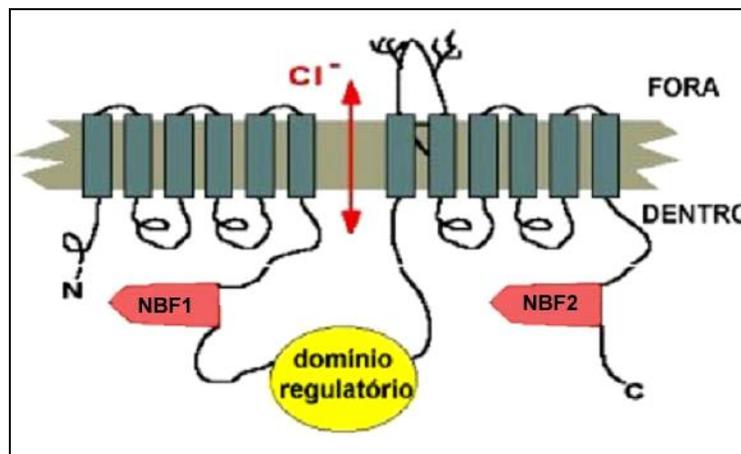


Figura 1. Estrutura da proteína *CFTR* (adaptado de Rowntree e Harris, 2003).

A sequência de ativação dos canais de Cl dá-se do seguinte modo: A proteína quinase A (PKA) fosforila sítios no domínio regulatório da proteína, produzindo um canal fechado, cuja abertura requer a ligação de MgATP a um ou aos dois domínios de ligação a nucleotídeos. A ligação do MgATP coloca o canal em um novo estado conformacional, podendo agora abrir espontaneamente. A reação inicial de fosforilação é reversível através de fosfatases (Frizzell, 1995).

Os domínios membranares formam o poro da proteína, ou seja constituem o canal propriamente dito. Mutações nesses domínios alteram a seletividade iônica do canal (Welsh e Smith, 1993). Já os domínios de ligação a ATP, controlam a atividade do canal pela hidrólise da ATP promovida pela fosforilação do domínio regulador. Cada domínio NBF possui uma função. O primeiro, NBF1, que é codificado pelas sequências encontradas nos éxons 9 ao 12, é responsável pela abertura do canal, enquanto o segundo, NBF2, codificado pelas sequências encontradas desde o éxon 19 ao 23, é responsável pelo fechamento deste (Zielenski e Tsui, 1995; Welsh e Smith, 1993).

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

1.1.3.2.1. Funcionamento da Proteína *CFTR*

O defeito básico da FC está associado com a diminuição da condução de íons Cl através da membrana apical de células epiteliais. Indivíduos afetados por FC possuem um comprometimento do transporte de cloreto. As consequências da perda de função da

proteína *CFTR* variam de acordo com os tecidos envolvidos. Nas glândulas sudoríparas, a *CFTR* normal funciona reabsorvendo o cloro do lúmen da glândula. Quando defeituosa, o cloro deixa de ser reabsorvido ficando em concentrações elevadas no lúmen. Como a *CFTR* também regula ORCC e EnaC (Devlin, 1998), quando está defeituosa, o cloro não é reabsorvido, já que o ORCC se torna inativo e o sódio, devido à hiperatividade do EnaC, é hipersecretado fazendo com que o cloro e o sódio sejam encontrados em concentrações elevadas no suor, levando ao conhecido “suor salgado” desses pacientes (figura 5).

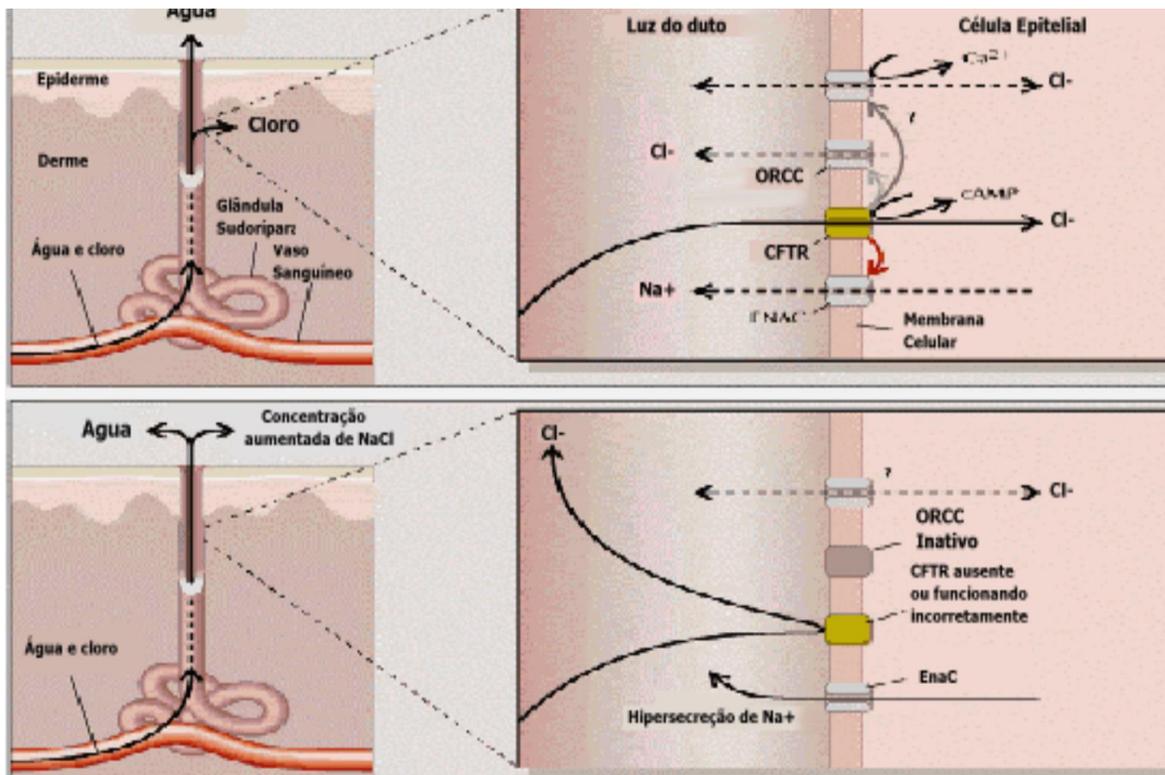


Figura 2 – Funcionamento da proteína *CFTR* normal (parte superior) e alterada (parte inferior) nas glândulas sudoríparas (modificada de Tsui e Durie, 1997).

Já em outros órgãos, como o pulmão e o pâncreas, a *CFTR* normal atua secretando o cloro (Figura 6), e não o reabsorvendo como ocorre nas glândulas sudoríparas (Hull, 2003). Portanto, o funcionamento da *CFTR* defeituosa, provoca um acúmulo do íon cloro dentro da célula, causando aumento do fluxo de sódio através dos canais de sódio (EnaC), com o objetivo de manter o equilíbrio eletroquímico interno da célula (Reis e Damaceno, 1998).

A combinação da diminuição da secreção do íon cloro, pela ausência ou mau funcionamento da *CFTR*, e do aumento da reabsorção de sódio e água, através do EnaC, resulta na diminuição do líquido de superfície das vias aéreas, conduzindo à desidratação das secreções respiratórias e ao aumento de sua viscosidade, favorecendo a obstrução dos ductos e infecções endobrônquicas (Ribeiro *et al.*, 2002).



Figura 3 - Funcionamento da proteína *CFTR* alterada no pulmão (Lewis e Clark, 2011)

1.1.3.3. Mutações Associadas à Fibrose Cística.

Existem mais de 1897 mutações, de diferentes tipos, relatadas no gene *CFTR* (Figura 1) (CFGAC, 2012).

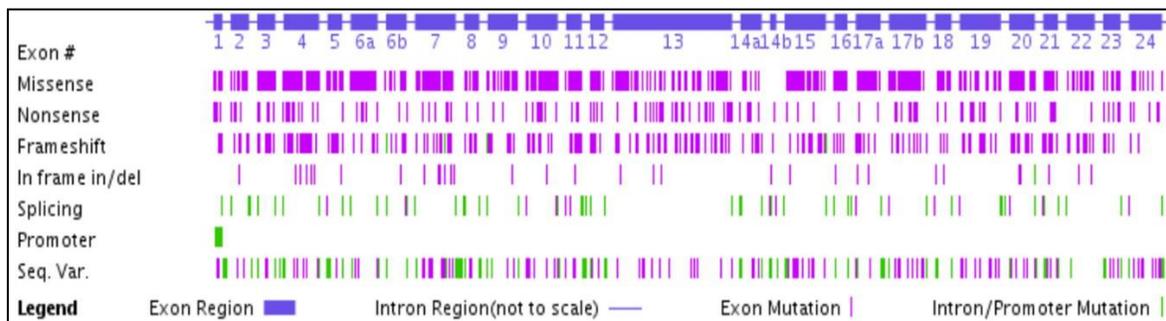


Figura 4. Representação dos diversos tipos de mutação ao longo do gene da *CFTR* (adaptado de Frizzell, 1995).

No resíduo 508 da proteína, ocorre a mutação mais frequente, a $\Delta F508$ (Figura 2), no éxon 10 do gene, que é caracterizada como uma deficiência de três pares de bases, a qual determina a perda de uma fenilalanina na proteína *CFTR* (Kerem *et al.*, 1989). A mutação $\Delta F508$ ocorre em 70% dos fibrocísticos nos USA (Knowles, 2006).

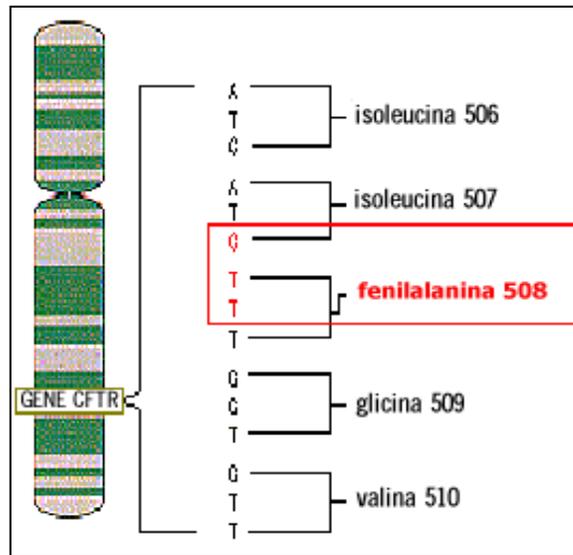


Figura 5. Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ da FC caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no éxon 10 (Adaptado de Welsh e Smith, 1993).

A prevalência da mutação $\Delta F508$ varia de acordo com a população estudada (Tabela 4). Assim, foram constatadas prevalências de 80% na Inglaterra; 70% na América do Norte (Chillon *et al.*, 1993); 67% na França (Chomel *et al.*, 1990); 50% na Espanha; 42% na região de Verona, na Itália, e 27% na Turquia (Chillon *et al.*, 1993). Devido à importância dessa anomalia e a frequência elevada dessa mutação, foi realizado um esforço conjunto de pesquisadores visando o mapeamento dessa mutação no Continente Europeu (European Working Group, 1990). Apesar da frequência elevada da mutação $\Delta F508$, mais de 1800 outras alterações gênicas foram descritas, a maioria localizada nos éxons 10 e 11. Nenhuma delas atinge prevalência tão elevada, quanto à mutação $\Delta F508$.

Tabela 4. Frequência da mutação $\Delta F508$ no mundo (Dawson e Frossard, 2000).

País	Frequência da $\Delta F508$ (%)
Dinamarca	87
Reino Unido	75
Estados Unidos	70
França	68
Alemanha	68
Bulgária	66
Argentina	57
Espanha	54
Itália	52
Grécia	52
Brasil	47
Portugal	44
México	34
Cuba	34
Judeus Askenazi	30
Turquia	19
Istambul	19

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

No Brasil, foi realizado um estudo inicial com 80 pacientes portadores de FC e foi verificada a presença das 5 mutações: Δ F508, G542X, G551D, R553X e N1303K. Verificaram que as mutações juntas perfazem cerca de 40% dos alelos mucoviscidóticos (26,03% - Δ F508; 6,85% - G542X; 2,74% - N1303K; 2,05% - G551D e 2,33% - R553X) (Parizotto, 1997).

Em um estudo de Correia (2005), na região de Campinas (SP) com 70 pacientes, a frequência das 6 principais mutações (SP) foi 50% para Δ F508, 4,29% para G542X, 2,14% para R1162X, 1,43% para N1303K, 0,71% para R553X.

0% para G551D,

1.1.3.3.1. Classes de Mutações

As mutações da FC foram classificadas em 5 diferentes classes (Figura 3), de acordo com o mecanismo através do qual a proteína *CFTR* alterada se apresenta (Welsh *et al.*, 2001).

As classes I, II e III são classificadas como as de fenótipo mais severo, já que englobam mutações que levam à produção de pouca ou nenhuma proteína (Zielenski e Tsui, 1995) e invariavelmente a uma IP (Zielenski, 2000).

As mutações da classe I resultam em defeito ou ausência de síntese da proteína, causada pelas mutações de “splicing”, mudança de matriz de leitura ou sem sentido

(Zielenski e Tsui, 1995). Entre as mutações mais frequentes desta classe encontra-se a mutação G542X, que produz um códon de parada da transcrição formando uma proteína truncada.

Nas mutações da classe II os defeitos ocorrem na maturação da proteína, impedindo que esta chegue à membrana, que seja processada e assuma sua conformação correta. Faz parte dessa classe a mutação mais frequente, a $\Delta F508$ (Welsh e Smith, 1993).

As mutações da classe III afetam o domínio regulatório, comprometendo a regulação do canal. Um exemplo dessa classe é a mutação G551D (Salvatore *et al.*, 2002).

Mutações nas classes IV e V estão associadas à função residual do gene *CFTR*, e são geralmente associadas a uma função pancreática satisfatória (Koch *et al.*, 2001; MCKone *et al.*, 2003).

As mutações de classe IV produzem uma proteína que é corretamente localizada na membrana e responde à estimulação da ATP, porém gera uma menor condução de íons cloro e diminui o tempo de abertura do canal. Como exemplo as mutações R117H e R347P.

As mutações de classe V alteram a estabilidade da proteína e o processamento da *CFTR* é normal, porém em quantidade reduzida, sendo que pequenos níveis funcionais desta são alocados na membrana (Rowntree e Harris, 2003).

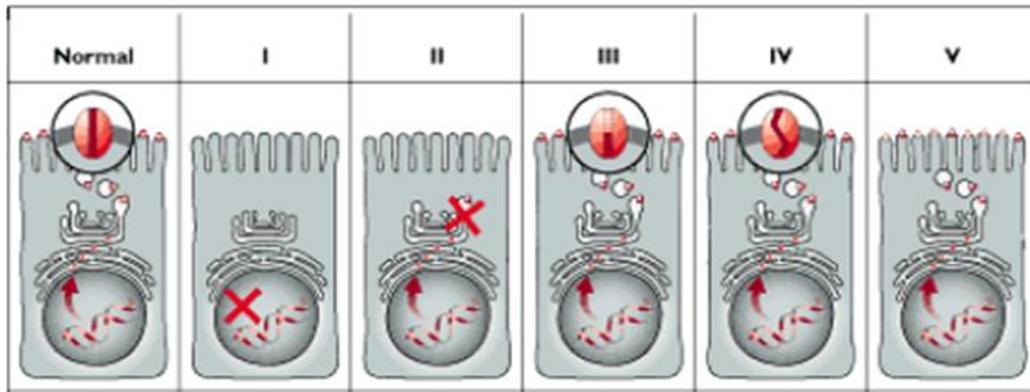


Figura 6. Esquematização celular das 5 classes de mutações na FC.

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

O número de classes foi estendido para seis (Vankeerberghen *et al.*, 2002), tendo sido incorporada a classe VI, que promovem alterações que afetam as propriedades de regulação da proteína *CFTR*, como exemplo a mutação A455E, localizada no éxon 9 do gene *CFTR*.

1.1.4. Principais Manifestações Clínicas da Fibrose Cística

A FC é uma doença que possui uma expressividade altamente variável, ou seja, a gravidade da doença pode variar muito entre as pessoas que a possuem, assim como sua idade de início, que varia desde o período neonatal até a vida adulta, com alguns pacientes sendo assintomáticos por vários anos (Simmonds *et al.*, 2010). É essencialmente uma doença pós-natal, com poucas manifestações clínicas ao nascimento, como íleo meconial, volvulus, atresia ou amputação intestinal, resultante da secreção intestinal anormal de muco. A gestação de crianças afetadas pela Fibrose Cística é de duração normal, sendo

apenas o peso ao nascimento levemente reduzido (Boyer, 1955). Em geral, a doença não se manifesta antes do nascimento e mesmo naqueles casos em que alguma manifestação ocorre, o desenvolvimento do feto é normal.

O fenótipo da FC é complexo e os seus pacientes exibem uma grande variedade de sintomas respiratórios, gastrointestinais e no aparelho reprodutor, bem como níveis elevados de eletrólitos no suor (Tsui, 1995).

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

A maioria dos pacientes apresenta os sintomas no início da vida, apenas uma pequena parte deles manifesta os sintomas tardiamente, na adolescência ou na idade adulta (Anderson *et al.*, 1992). As manifestações mais frequentes na época do diagnóstico foram descritas pela Cystic Fibrosis Foundation (CFF).

1.1.4.1. Sistema Respiratório

Problemas no sistema respiratório são responsáveis por mais de 90% da morbidade e mortalidade em pacientes com FC (Tebbutt *et al.*, 1998), apresentando-se de forma progressiva e de intensidade variável (Alvarez, 2002). Esta intensidade de acometimento é que determina o prognóstico da doença. Ao nascimento, as crianças com FC apresentam pulmões estruturalmente normais, mas com o tempo, infecções e inflamações sucessivas, culminam em hipertensão pulmonar e insuficiência respiratória crônica (Hodson, 2000).

Ao nascimento, o pulmão é histologicamente normal e as alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas. A lesão inicial é a dilatação e hipertrofia das glândulas secretoras de muco (Sturgess, 1982). Ocorre infiltração linfocitária aguda e crônica. Podem ocorrer pneumonias de repetição, principalmente em pacientes mais jovens (Bedrossian *et al.*, 1976). Com a evolução formam-se bronquiectasias, por causa da incapacidade do indivíduo em esterilizar o trato respiratório e diminuir o processo inflamatório (Tomashefski *et al.*, 1986).

Devido à ineficiência na eliminação do muco, os pulmões ficam altamente suscetíveis à infecção bacteriana. Os microrganismos mais comumente encontrados são: *Pseudomonas aeruginosa* (80%), o que resulta em perda progressiva da função pulmonar levando à morte (Demko *et al.*, 1995), *Staphylococcus aureus* (28,3%), *Haemophilus influenzae* (8,9%) e *Burkholderia cepacia* (3,2%) (Robinson, 2001). O *Staphylococcus aureus* é o primeiro microrganismo a colonizar os pacientes, predispondo o organismo para a colonização pela *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). A bactéria mais comum, a *P. aeruginosa*, coloniza a maioria dos pacientes com FC antes dos 10 anos de idade. As cepas não-mucóides ocorrem no início da colonização que ao tornar-se crônica são substituídas por cepas mucóides. A colonização por essa bactéria é claramente a principal causa da doença pulmonar progressiva na maioria dos indivíduos. Já a bactéria *Burkholderia cepacia* aparece em uma fase mais tardia e constitui um problema terapêutico grave que evolui como uma infecção pulmonar fulminante, frequentemente fatal, devido à elevada resistência natural deste microrganismo à grande maioria dos antibióticos conhecidos (Alvarez, 2002).

1.1.4.2. Sistema Digestivo

As manifestações clínicas relacionadas ao aparelho digestivo são variáveis. A mais importante e frequente é a disfunção pancreática, que, quando presente, pode ter início na fase fetal, levando à insuficiência exócrina do pâncreas que segundo Maclusky e Levison (1990) ocorre ainda no período intrauterino, quando há uma inflamação, com perda de função e fibrose do órgão. Cerca de 80 a 90% dos pacientes são acometidos apresentando grau variável e progressivo de comprometimento do órgão devido à obstrução dos ductos pela presença de secreções densas e desenvolvimento gradual de fibrose no órgão (Salvatore *et al.*, 2002). A causa dessa disfunção é a obstrução causada por secreções espessas e a subsequente destruição das glândulas exócrinas do pâncreas, que resultam em deficiência pancreática enzimática e desnutrição (Korst *et al.*, 1995).

A apresentação clínica caracteriza-se por diarreia crônica, com evacuações de fezes volumosas e gordurosas, sendo percebidos restos alimentares (Reis e Damaceno, 1998). A desnutrição se instala rapidamente pela perda de calorías, vitaminas e proteínas devido à má digestão alimentar, além do aumento das necessidades calóricas causado pelas infecções respiratórias de repetição que conduzem a um baixo ganho pondero-estatural (Reis e Damaceno, 1998).

A mais importante das manifestações intestinais da FC é o íleo meconial, decorrente da obstrução do lúmen ilíaco por massa meconial viscosa. O recém-nascido tem dificuldade para eliminar seu material gastrointestinal (mecônio), que acaba por bloquear o intestino. A obstrução intestinal com íleo meconial ocorre em 10 a 20% dos pacientes recém-nascidos (Anderson *et al.*, 1992).

Os sinais de obstrução intestinal podem aparecer dentro de 48 horas após o nascimento. Evans e colaboradores (2001) demonstraram que pacientes com FC que tiveram íleo meconial apresentaram uma piora na prova de função pulmonar quando comparados a pacientes que não o tiveram e foram diagnosticados por triagem neonatal. Deste modo, esses autores sugerem que o íleo meconial esteja associado a um fenótipo mais grave da doença.

A síndrome da obstrução intestinal distal é equivalente ao íleo meconial que ocorre em adolescentes e adultos com FC e também ocorre em 10 a 20% dos casos (Alvarez, 2002). Esta é a consequência do material muco-fecal apresentar uma viscosidade anormal no íleo terminal e no cólon direito, onde o bolo fecal é normalmente líquido, provocando grande dor abdominal com uma massa palpável na fossa ilíaca direita, sendo que os sintomas são exacerbados após a alimentação.

1.1.4.3. Sistema Reprodutor

A infertilidade é um sintoma comum nos pacientes, principalmente nos homens, sendo que 98% dos homens com FC são estéreis. Agenesia Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (CBAVD – “Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens”) é uma doença autossômica recessiva relacionada à infertilidade que acomete homens saudáveis. Aproximadamente 6% dos casos de azoospermia são por CBAVD (Bernardino *et al.*, 2003). Aproximadamente 75% dos homens diagnosticados com CBAVD, possuem mutações para a FC (Chillón *et al.*, 1995). Em 98% dos homens fibrocísticos ocorre azoospermia devido à obstrução do canal deferente.

A CBAVD é caracterizada por atrofia, fibrose ou ausência do epidídimo, vaso deferente, vesícula seminal e ductos ejaculatórios (Quinzii e Castellani, 2000). A patologia associada às alterações estruturais provavelmente está associada à obstrução do trato reprodutivo, devido ao muco espesso, no período intrauterino (Kaplan *et al.*, 1968).

Na maioria dos casos, a espermatogênese não está comprometida, porém, as alterações obstrutivas não permitem que os espermatozoides cheguem à uretra. Nestes casos, a opção seria a fertilização assistida, levando em consideração a possibilidade de riscos de FC para a descendência do casal (Moutou *et al.*, 2002).

Já a fertilidade diminuída das mulheres fibrocísticas, que ocorre em 60% das pacientes (Gilljam *et al.*, 2000), está relacionada ao muco cervical espesso, que ainda possui características bioquímicas alteradas, agindo como um espermicida.

1.1.5. Diagnóstico da Fibrose Cística

O diagnóstico da FC nunca foi simples. É uma doença multissistêmica apresentando uma grande variabilidade de manifestações clínicas, com diferentes graus de acometimento e com início de manifestação variável. Apesar de manifestar-se por formas atípicas, a CFF, em 1997, propôs algumas características fenotípicas, que devem nortear o diagnóstico da doença (embora os autores admitam que provavelmente não cubram todos os quadros clínicos possíveis), tais como:

- História familiar da doença;
- Anormalidades intestinais (síndrome da obstrução intestinal distal, prolapso retal e íleo meconial, ocorrendo em cerca de 10% dos recém-nascidos com FC) e pancreáticas

(dificuldade de ganho de peso adequado durante a infância, embora demonstrando um apetite voraz, evacuações frequentes de fezes gordurosas com forte odor);

- Doença pulmonar ou sinusal crônica, manifestada por colonização/infecção, alterações persistentes na radiografia do tórax (bronquiectasias, atelectasias, opacificações e hiperinsuflação com obstrução das vias aéreas), tosse frequente e repetitiva com produção de catarro, episódios de respiração difícil, retração dos tecidos moles nas áreas supraclaviculares, supraexternal, intercostais e sub-costais (Campos *et al.*, 1996; Correia, 2005);

- Teste positivo da triagem neonatal (dosagem da tripsina imunoreativa);

- Atresia do canal deferente, resultando em azoospermia obstrutiva.

Até 1930, a doença era reconhecida como uma síndrome clínica, mas as características não eram claramente distintas daquelas de outras causas de má absorção e retardo no crescimento, como a intolerância ao glúten (ou doença celíaca) (Andersen, 1938).

Para a grande maioria dos pacientes o diagnóstico é sugerido pela presença de uma ou mais características clínicas, história familiar de FC, ou resultado positivo de teste de triagem neonatal, o qual é confirmado por evidência laboratorial de disfunção do gene *CFTR* (Rosenstein e Cutting, 1998).

A FC clássica pode ser diagnosticada ou excluída pelo teste do suor. Para alguns pacientes com poucos sintomas presentes, no entanto, testes mais extensivos, como o molecular, são necessários para identificar variantes mais brandas. O diagnóstico da doença proporciona aconselhamento genético e vigilância pulmonar apropriada, o que pode se

tornar cada vez mais importante à medida que os avanços terapêuticos melhoram o prognóstico (Stern, 1997). Critérios para o diagnóstico da FC são relacionados no quadro 1.

Quadro 1 - Critérios para o diagnóstico da FC (Rosensteins & Cutting, 1998).

Uma ou mais características fenotípicas
- ou história familiar de FC
- ou resultado de teste de triagem neonatal positivo E concentração aumentada de cloreto no suor por iontoforese com pilocarpina em duas ou mais ocasiões
- ou identificação de duas mutações no gene <i>CFTR</i>
- ou demonstração de transporte anormal de íons no epitélio nasal (diferença de potencial nasal)

1.1.5.1. Teste do Suor

O folclore suíço e austríaco já observava, em tempos medievais, que uma criança que tinha gosto salgado ao ser beijada era considerada enfeitiçada e morria precocemente. No entanto, somente em 1953, Di Sant’Agnese e colaboradores demonstraram o excesso de sal no suor de pacientes com FC (Wilcken e Wiley, 2003). Ainda hoje, na maioria dos casos, o diagnóstico de FC é confirmado pela medida da concentração de cloreto no suor (Rosenstein, 1998). O teste é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da FC, com elevadas sensibilidade e especificidade (>95%), baixo custo e a vantagem de não ser invasivo. Atualmente, o único método que permanece clinicamente confiável é o da iontoforese quantitativa por pilocarpina, padronizado por Gibson e Cooke, em 1959. O exame é realizado através da estimulação das glândulas sudoríparas pela aplicação da

pilocarpina em área da pele do antebraço, com coleta de suor pela iontoforese (Alvarez, 2002). A quantidade de suor necessária é de no mínimo 100mg. O resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior que 60mEq/L. Valores menores que 45mEq/L são considerados normais; adolescentes e adultos jovens podem ter valores mais elevados, e desta forma resultados entre 45 e 60 mEq/L são considerados duvidosos e o exame deve ser repetido. Resultados falso-positivos e falso-negativos são frequentemente detectados (Wilmott, 1998).

Pela gravidade da doença e pelo seu prognóstico reservado, o diagnóstico de FC somente poderá ser firmado com dois testes positivos, realizados em momentos diferentes. Não existe correlação entre a concentração de íons no suor e a gravidade da doença (Ribeiro *et al.*, 2002).

1.1.5.2. Dosagem de Tripsina Imunorreativa (TIR)

O exame mais utilizado para o diagnóstico da FC é a dosagem quantitativa da tripsina imunoreativa (TIR), por imunofluorimetria, que é baseado no aumento do tripsinogênio no sangue, secundário ao refluxo de secreção pancreática, provocado pela obstrução dos ductos pancreáticos.

O teste deve ser realizado na primeira semana de vida, com amostras de sangue impregnadas em papel-filtro especial, como na coleta para pesquisa de fenilcetonúria e hipotireoidismo. A dosagem da TIR é um indicador indireto da FC, pois avalia apenas a integridade da função pancreática. Um teste com valores acima do padrão adotado, 70 ng/ml, deverá ser repetido num intervalo de 15 a 30 dias, e se persistir positivo, o paciente deverá ser submetido ao teste do suor, para confirmar o diagnóstico de FC.

Embora este teste tenha uma eficiência de 95,3%, segundo dados obtidos em um trabalho realizado na região de Victória na Austrália, entre os anos de 1989 e 1998 (Massie *et al.*, 2000), deve haver uma confirmação do resultado através do teste molecular ou teste do suor, pois há possibilidade de falsos positivos e/ou falsos negativos. Um teste negativo de TIR não exclui FC na ausência de insuficiência pancreática (Ribeiro, 2002).

Através de uma portaria, o Ministério da Saúde, tornou obrigatória a realização da triagem da FC como parte do “*teste do pezinho ampliado*”, portanto os médicos pediatras devem ser alertados sobre como interpretá-lo corretamente. Apesar disto, cerca de 3 milhões de crianças que nascem no Brasil todo ano, apenas 1,8 milhão têm acesso ao teste (Ribeiro, 2002).

1.1.5.3. Condutividade

A condutividade é um método alternativo e não-seletivo para a medida de íons no suor, que estão aumentados em pacientes com FC e sua quantificação foi proposta como teste diagnóstico. A Fundação para Fibrose Cística dos Estados Unidos (Cystic Fibrosis Foundation) aprovou um condutímetro especialmente desenhado para uso com o coletor de suor Wescor Macroduct, como método de triagem. Há excelente correlação entre os resultados das concentrações de cloro e a condutividade no suor. Um resultado de condutividade igual ou superior a 50 mmol/l é considerado positivo e deveria ser confirmado por um teste do suor quantitativo (Rosenstein, 1998).

1.1.5.4. Análise genética

O diagnóstico molecular da FC é muito útil para identificar precocemente os pacientes e assim, dar início ao tratamento mais adequado, o mais rápido possível. Isto tem se mostrado significativo para uma melhora na qualidade de vida e, conseqüentemente, uma longevidade desses pacientes. Este fato não é uma realidade em países como o Brasil em que a maioria dos casos permanece, provavelmente, sem diagnóstico e principalmente, pela existência de muitas famílias em situação socioeconômica não privilegiada (Streit *et al.*, 2003).

A identificação de duas mutações conhecidas confirma o diagnóstico de FC, sendo decisivo naquele paciente que apresenta quadro clínico compatível e teste do suor inconclusivo. A análise das mutações é de alto custo, e poucos centros no Brasil estão capacitados a realizá-la. A triagem das 25 mutações mais frequentes detecta 80 a 85% dos alelos de pacientes com FC. Dessa forma, a confirmação do diagnóstico pelo teste genético é extremamente específica, porém não muito sensível (Ribeiro, 2002).

1.1.6. Prognóstico da Fibrose Cística

O prognóstico da FC relaciona-se com a herança genética, presença de IP, sexo, idade de início e a gravidade das manifestações clínicas respiratórias. A presença da mutação $\Delta F508$, na forma homozigótica, relaciona-se com insuficiência pancreática, maior gravidade da doença pulmonar e colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa* (Ribeiro, 2002). Com os avanços na terapêutica padronizada para pacientes com FC ao longo dos anos, a média de sobrevida aumentou espetacularmente. Enquanto na década de 1950 essencialmente todos os pacientes morriam até os 10 anos de idade, na década

passada aproximadamente um terço dos pacientes com FC estava sobrevivendo até a idade adulta. Este aumento na média de sobrevida teve um impacto marcante na natureza da FC como doença infecciosa, uma vez que uma maior sobrevida dos pacientes com FC criou oportunidades para o estabelecimento de infecções por outras bactérias além de *Staphylococcus aureus*. Atualmente, *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno pulmonar mais prevalente nos pacientes com FC (Lyczak, 2002).

Dados do registro de pacientes com FC dos Estados Unidos demonstram que a média de idade do óbito aumentou de 8,4 anos em 1969 para 14,3 anos em 1998, e a média de tempo de sobrevida aumentou de 14 anos em 1969 para 32 anos em 2000. Outros países têm também apresentado melhora destas taxas, embora persistam diferenças significativas na sobrevida. Estas diferenças podem ser afetadas por estratégias de tratamento, acesso a centros especializados e condição socioeconômica (Ratjen e Doring, 2003). Uma análise multivariada acompanhou a evolução de 127 pacientes em Minas Gerais por um período de 20 anos. Foi usado um modelo estatístico que permitia uma avaliação objetiva do risco de morte, e podia ser usado para aconselhamento da família do paciente. O estudo detectou um excesso de risco de morte nos pacientes com escore de Shwachman abaixo de 70, idade ao diagnóstico menor que 3 anos e peso ao nascimento de menos de 3kg (Oliveira, 2002). O escore de Shwachman avalia o estado geral dos pacientes correlacionando a 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 e, portanto o escore, pior o quadro clínico (Alvarez, 2002).

O fator idade ao diagnóstico poderia ser especulado como peculiar em países em desenvolvimento como o Brasil, possivelmente devido a somente casos de FC com

apresentação clínica severa serem acompanhados, enquanto casos moderados a leves, especialmente em áreas rurais, podem ser subdiagnosticados. A intensidade das anormalidades pulmonares varia muito e os casos mais severos procuram mais precocemente por diagnóstico e tratamento. O diagnóstico tardio de casos clinicamente inaparentes ou menos severos não piora necessariamente o prognóstico (Camargos *et al.*, 2000).

1.1.7. Genes modificadores na Fibrose Cística

Em um estudo realizado em gêmeos mono e dizigóticos encontrou-se uma forte contribuição genética na doença pulmonar sem, contudo, ser dependente do genótipo *CFTR* (Santis *et al.*, 1992).

Interações entre mutações genéticas, genes modificadores e fatores ambientais contribuem para a grande variabilidade fenotípica e severidade da doença (Alves *et al.*, 2007).

Atualmente tem-se relatado a ação de outros genes sobre o fenótipo, sendo responsáveis, geralmente pela variabilidade clínica. Os genes que modulam a gravidade e variabilidade são denominados modificadores e diversas estratégias têm sido elaboradas para sua identificação e caracterização (Houston e Tomlinson, 1998).

O ambiente é um fator que não pode ser controlado para a análise estatística. No entanto, os genes modificadores são os alvos de estudos e permitem uma melhor compreensão da variabilidade clínica da doença, especialmente nos aspectos da doença pulmonar. Um locus modificador é distinto daquele da doença e acarreta em variação quantitativa e/ou qualitativa no fenótipo da doença (Houston e Tomlinson, 1998; Soferman,

2006). Os genes modificadores podem atuar por diferentes caminhos, sendo as principais possibilidades: (i) em células ou tecidos específicos, ou ter ação sistêmica; (ii) efeitos qualitativos ou quantitativos, ambos em nível da proteína ou no fenótipo da doença; (iii) ação específica na apresentação da doença, bem como ação inespecífica; (iv) ação direta ou controlada sobre a mutação que acarretada a doença, bem como, sobre condições ambientais específicas (Houston e Tomlinson, 1998; Merlo e Boyle, 2003; Accurso e Sontag, 2003; Sliker *et al.*, 2005; Marson, 2011).

O conceito de múltiplos modificadores genéticos na doença Mendeliana, como na Fibrose Cística, é diferente do conceito de múltiplos variantes genéticos na doença não Mendeliana, como na asma. Nas doenças genéticas complexas, variantes genéticas múltiplas interagem umas às outras (e o ambiente) causando a doença. Ao contrário, a Fibrose Cística é causada por mutações no gene *CFTR*, e variações genéticas que relatam a cascata de patogénia da mutação no gene *CFTR*, modificam a gravidade do fenótipo. De fato, polimorfismos genéticos que apresentam um pequeno efeito ou não em sujeitos normais, podem ser modificadores da doença na Fibrose Cística (Knowles, 2006; Alves *et al.*, 2007; Marson, 2011)

Para esclarecer como ocorre à apresentação do quadro clínico na FC, observe a Figura 7.

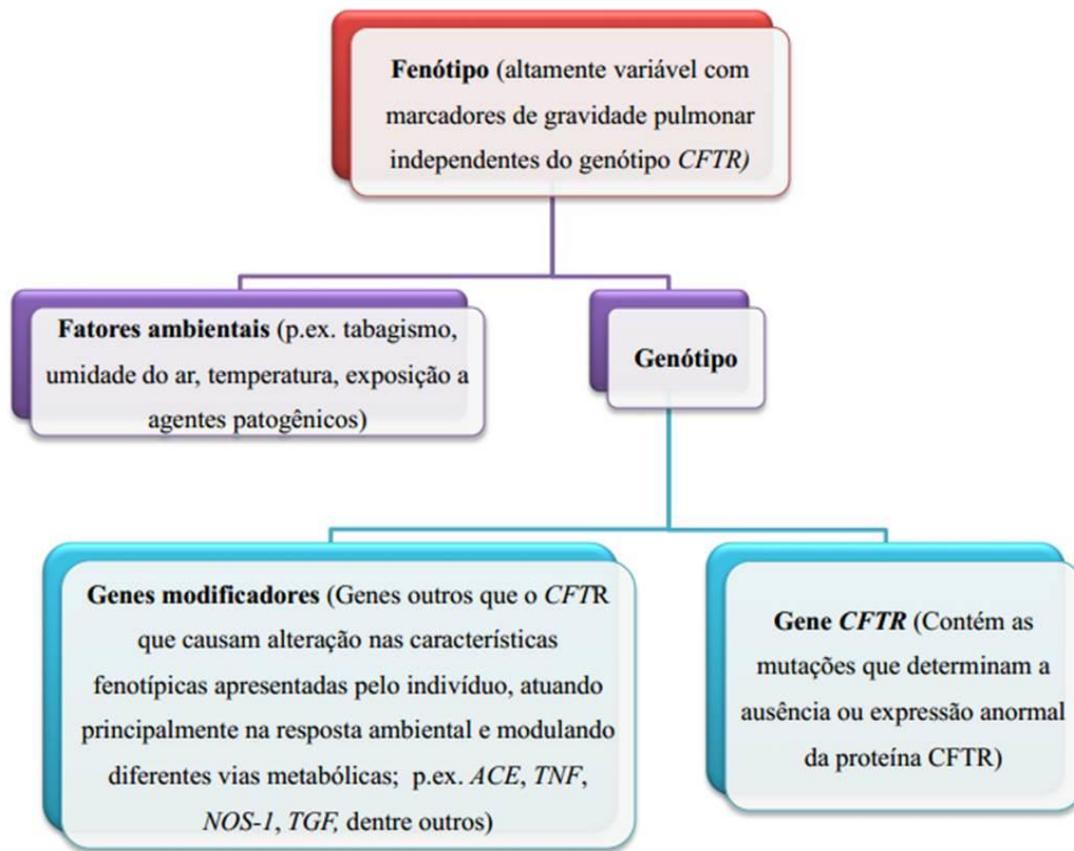


Figura 7. Fatores atuantes na apresentação clínica da FC (Marson, 2011).

Na FC, a variabilidade clínica está associada com as variáveis clínicas, no entanto, há muito ainda para ser analisado. Genes modificadores associados à resposta imune têm sido um alvo para o estudo da modulação genética e de novas drogas, tais como os genes *ADRA2A* e *TCF7L2*.

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

Consequentemente, é preciso verificar a sua ocorrência em nossas populações para que sirva como elemento diagnóstico e apoiador de iniciativas de saúde pública além do acompanhamento mais efetivo das pessoas.

1.1.7.1. Gene *TCF7L2*

O Transcription factor 7-like 2 ou *TCF7L2*, antigamente referido como *TCF-4* (Transcription fator 4) está localizado no cromossomo 10, região q25.3 e possui 217.429pb divididos em 18 éxons (Prokunina-Olsson *et al.*, 2009).

TCF7L2 é um gene capaz de influenciar a transcrição de vários genes. Portanto, exerce uma grande variedade de funções no interior da célula.

É um fator de transcrição e um componente essencial da via de sinalização Wnt, cujo termo advém da combinação de Wg (wingless) e INT, genes que codificam proteínas de integração, e podem ser pronunciados wint.

A transdução da via Wnt é uma das vias centrais que controlam o crescimento e diferenciação dos organismos. Está envolvida no desenvolvimento de uma grande variedade de linhagens de células e órgãos (Chien *et al.*, 2007; Marquezine, 2009). Em um dos principais ramos da Wnt, denominado via canônica, Wnts se ligam a receptores *frizzled* em conjunto com correceptores da família LRP (Leucine-responsive Regulatory Protein). A ativação resultante da via previne a fosforilação da B-catenina e sua degradação subsequente. A Beta-catenina estabilizada transloca-se para dentro do núcleo onde ela interage com os fatores de transcrição da família TCF para ativar a expressão de genes alvo do *TCF7L2*. Em conclusão, acredita-se que a regulação controlada desse mecanismo de sinalização leva à proliferação e diferenciação normais em tecidos-chave para a patogênese do DM2, como o adiposo e, possivelmente, o pâncreas endócrino (Duval *et al.*, 2000; Welters *et al.*, 2008)

Polimorfismos de *TCF7L2* foram associados à secreção de insulina diminuída, a produção de glicose, e a tolerância à glicose por meio de efeitos diretos nas células betapancreática das ilhotas.

Assim, embora o mecanismo específico de condução do desenvolvimento de diabetes tipo 2 não seja claro, existem evidências suficientes para demonstrar que variantes no gene *TCF7L2* podem aumentar o risco de desenvolvimento de DM2 e/ou a progressão para diabetes com tolerância diminuída à glicose.

Há poucos estudos que investigam o papel da *TCF7L2* sobre a secreção de insulina em ilhotas isoladas. Recentemente, um estudo realizado por Shu e colaboradores relataram que o silenciamento de *TCF7L2* por siRNA resultou numa forte inibição da secreção de insulina em ilhéus humanos e rato. Por outro lado, a superexpressão de *TCF7L2* secreção de insulina estimulada. A maneira como os níveis da proteína modulam a secreção de insulina não foi estabelecida no estudo. Porém, sabe-se que o silenciamento de *TCF7L2* exerce um forte efeito inibidor sobre a secreção de insulina induzida pela glicose.

A expressão do *TCF7L2* em ilhotas humanas foi 5 vezes maior em diabéticos, o que foi associado à redução da secreção de insulina estimulada por glicose nessas células, reforçando o envolvimento do gene na patogênese da diabetes (Lyssenko *et al.*, 2007; Marquezine, 2009).

1.1.7.1.1. Polimorfismo no gene *TCF7L2*.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido consistentemente associados com Diabetes Mellitus tipo 2 em populações de diferentes origens étnicas, fazendo do *TCF7L2*, hoje, um dos loci mais importantes para a predisposição a DM2 (Franco *et al.*, 2011)

Em uma população islandesa, Grant e colaboradores (2006) encontraram forte desequilíbrio de ligação entre um SNP no íntron 3 (rs7903146), rs12255372 no íntron 4 e um marcador de microssatélites no íntron 3, DG10S478.

Prokunina-Olsson e colaboradores (2009) afirmaram que rs7903146 e rs12255372 estão a 50 kb de distância e dentro de um bloco de 92 kb em forte desequilíbrio de ligação e mostraram igualmente forte associação com diabetes tipo 2 (figura 8).

Entre os SNPs, as variantes rs7903146 e rs12255372 são mais significativamente associadas com o risco de DM2. Além disso, estes SNPs têm sido relacionados com o metabolismo prejudicado da glicose.

O rs12255372 também é conhecido como IVS4G>T e, além da Diabetes tipo 2, está ligado ao câncer de mama e à forma agressiva do câncer de próstata.

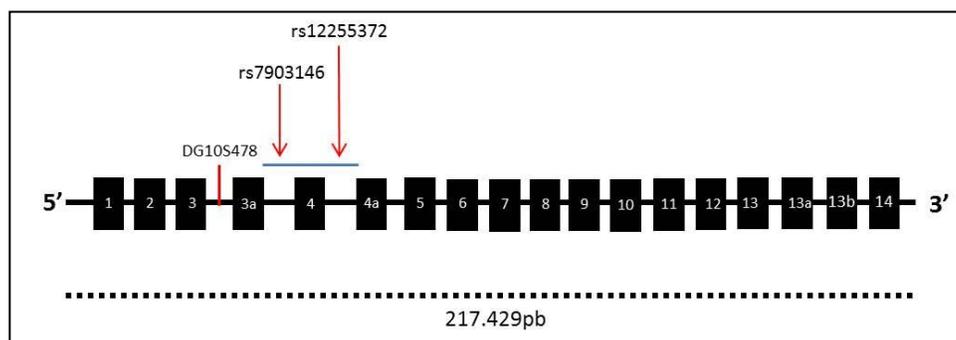


Figura 8. Estrutura do gene *TCF7L2*. Microssatélite DG10S478 e polimorfismos rs7903146 e rs12255372 (adaptado de Prokunina-Olsson *et al.*, 2009).

1.1.7.2. Gene *ADRA2A*

Na FC, a variabilidade clínica está associada com variáveis clínicas, no entanto, ainda há muito a ser analisado, e genes modificadores que são associados à resposta imunológica têm sido alvos de estudo de modulação genética e identificação de novas terapêuticas (Drumm *et al.*, 2012; Knowles *et al.*, 2012; Dorfman *et al.*, 2012). Entre estes, o gene Receptor Adrenérgico alfa-2A (*ADRA2A*) foi estudado.

ADRA2A foi mapeado por Yang-Feng e colaboradores (1987) na região q24-26 do cromossomo 10, possui 3650pb e apenas 1 éxon de 1353pb. Codifica uma proteína com 450 aminoácidos, conhecida como receptor alfa-2A adrenérgico (α 2-AR).

Receptores adrenérgicos são divididos em 2 classes, alfa e beta, e cada uma delas é dividida em 2 subclasses denominadas alfa-1 e alfa-2 e beta-1 e beta-2.

Para os receptores alfa-2, os 3 subtipos identificados foram alfa-2A, alfa-2B e alfa-2C (Bylund, 2005). Cada um dos subtipos do receptor adrenérgico alfa-2 é específico na distribuição em tecidos e células, padrão ontogenético, regulação e funções fisiológicas (Shishkina e Dygalo, 2002).

O receptor adrenérgico alfa-2, particularmente o subtipo alfa-2A, é uma proteína chave no controle do sistema que regula atenção, vigilância e memória (Maestu *et al.*, 2008), mediando outras importantes respostas fisiológicas, particularmente no sistema cardiovascular e sistema nervoso central, e dessa forma participam, em todos os aspectos, do estresse e da excitação, incluindo funções cognitivas, respostas cardiovasculares e efeitos metabólicos (Lafontan e Berlan, 1993).

Os receptores alfa-2A adrenérgicos são parte de uma família de receptores acoplados à proteína G estimulados por catecolaminas (epinefrina e norepinefrina). De um

modo geral, ao receber este estímulo, os receptores adrenérgicos ativam as proteínas G que irão estimular as enzimas, tais como a adenilato ciclase e a fosfolipase C, para induzir a produção de mensageiros secundários, tais como, monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) ou inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diaciglicerol (DAG) e Ca²⁺. A α 2-AR acoplado à proteína G, em vez disso, inibe a adenilato-ciclase e a subsequente formação de cAMP (Kobilka *et al.*, 1987; MacDonald *et al.*, 1997).

A α 2-AR é encontrada nas células adrenérgicas e é altamente expressa em nervos simpáticos, córtex cerebral, hipocampo, septo, amígdala, hipotálamo, cordão umbilical, coluna vertebral, ilhotas pancreáticas, plaquetas e células do sistema imunológico (macrófagos, células polimorfonucleares e linfócitos T). A proteína α 2-AR reduz o tônus simpático e níveis norepinefrina, pressão arterial e frequência cardíaca, proporcionando sedação e analgesia.

A proteína α 2-AR também está envolvida no metabolismo da glicose e lipídeos, regulação da temperatura corporal, agregação de plaquetas, produção de citocina pró-inflamatória, na cognição e no comportamento (Kurnik *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2011).

Estudos têm correlacionado a expressão da α 2-AR com risco de Diabetes Mellitus, intensidade do processo inflamatório pulmonar durante as infecções bacterianas e asma alérgica associada à broncoconstrição (Ying *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2007; Rosengren *et al.*, 2010). *ADRA2A* tem importância no sistema imune, particularmente em resposta às bactérias que colonizam as vias respiratórias.

Neste contexto, estudo dos polimorfismos do gene *ADRA2A* é importante para elucidar a variabilidade clínica em doenças inflamatórias, incluindo a FC.

1.1.7.3. Polimorfismos no gene *ADRA2A*

Os polimorfismos rs10885122 (G>T) e rs553668 (A>G) são dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados na região intragênica e na região 3' não traduzida (3'UTR), respectivamente (figura 9).

No estudo de Renström e colaboradores (2011) na Suécia e de Dupuis e colaboradores (2010) nos Estados Unidos foi descoberta a associação desses polimorfismos com o aumento da concentração de glicose em jejum.

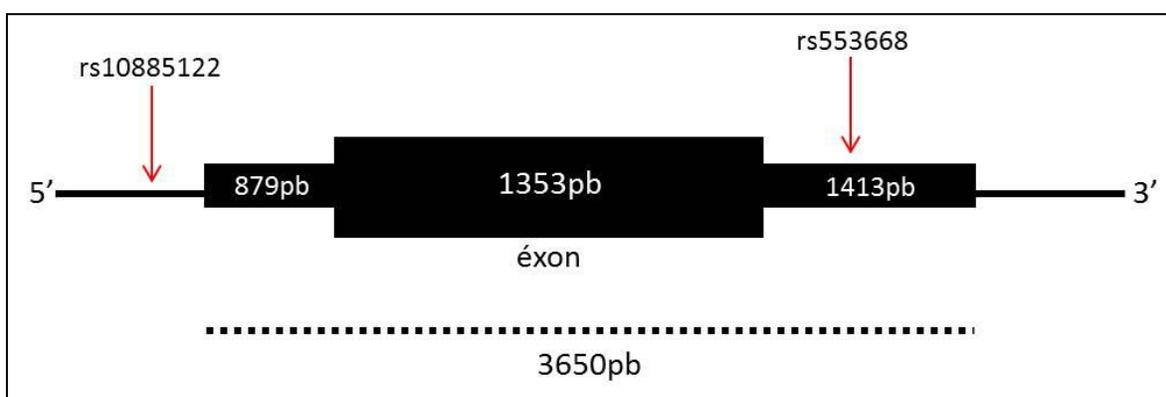


Figura 9. Estrutura do gene *ADRA2A*. Localização dos polimorfismos rs10885122 e rs553668 (adaptado de Cerqueira, 2009).

1.2. Diabetes Mellitus Relacionada à Fibrose Cística (DRFC)

1.2.1. Epidemiologia

Desde que a FC foi reconhecida como doença, houve um aumento importante na sobrevida desses pacientes relacionada à conduta de prevenção, tratamento do íleo meconial ao nascimento, suporte nutricional adequado, fisioterapia respiratória e antibioticoterapia precoce para as infecções pulmonares, melhora do tratamento antimicrobiano, não podendo desconsiderar, contudo, que o cuidado durante a infância com equipes multidisciplinares em centros especializados influencia notadamente no desfecho clínico e, por consequência, na sobrevida desta população (Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008; Chakr *et al.*, 2006; Della Manna *et al.*, 2008).

Nos anos 1930, a expectativa de vida era de cinco anos e hoje a expectativa média de vida para crianças nascidas no ano 2000 é de 40 anos (Garagorri *et al.*, 2001; Della Manna *et al.*, 2008).

O aumento da longevidade tem ocasionado maior incidência de complicações extrapulmonares e entre elas estão as alterações do metabolismo dos carboidratos na forma de intolerância à glicose até a Diabetes Mellitus relacionada à fibrose cística (DRFC) (Brennan *et al.*, 2004; Spence, 2005; Alves *et al.*, 2007; Della Manna *et al.*, 2008).

A diabetes relacionada à fibrose cística (DRFC) é a principal co-morbidade em mais de 20 mil portadores de FC notificados no National Cystic Fibrosis Patient Registry que é um registro nacional norte-americano, informatizado, mantido há mais de 30 anos (CFF; Della Manna *et al.*, 2008). Estima-se que o DRFC acometa aproximadamente 25% dos

adolescentes e 40-50% dos adultos com FC (Moran *et al.* 1999; Mackie *et al.*, 2003; Blackman *et al.*, 2009).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do DRFC, além do aumento da sobrevida, são o aumento da longevidade, sexo feminino, insuficiência pancreática exógena, homozigose para mutação DF508, infecções pulmonares e corticoterapia (Alves *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 1999; Rosenecker *et al.*, 1995; Hardin e Moran, 1999; Lanng *et al.*, 1994; Della Manna *et al.*, 2008).

O risco de DM na FC é, aproximadamente, 10 vezes maior que na população geral e o risco de DM2 chega a ser 20 vezes maior. Frequentemente, manifesta-se entre 15 e 21 anos de idade (Blackman *et al.*, 2009; Cowie *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2007; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

O início do DRFC frequentemente não é notado, pois os sintomas podem ser confundidos com os da FC (Costa *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 1999).

Estudos retrospectivos mostraram declínio pulmonar e perda de peso 2 a 4 anos antes do diagnóstico de DRFC (Costa *et al.*, 2007). A mortalidade é seis vezes maior em pacientes com DRFC do que em pacientes com FC sem diabetes (Moran *et al.*, 1999; Brennan *et al.*, 2007; Preumont *et al.*, 2008; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

O declínio da função pulmonar é mais acelerado nos pacientes intolerantes à glicose, do que naqueles com metabolismo glicêmico normal.

A diminuição da sobrevida e aumento da morbi-mortalidade faz com que o diagnóstico precoce seja fundamental. Como seu início é muitas vezes insidioso, ressalta-se a importância de observar sintomas sugestivos de DRFC, como piora da função pulmonar,

perda ponderal significativa e queda do estado geral. O acompanhamento multidisciplinar tem papel fundamental na adesão e melhora clínica destes pacientes (Alves *et al.*, 2007).

1.2.2. Fisiopatologia

A fisiopatologia do DRFC inclui a concorrência de anormalidades estruturais do pâncreas exócrino e endócrino; insuficiência funcional do pâncreas endócrino e aumento da resistência periférica à ação da insulina (Hardin e Moran, 1999; Moran *et al.*, 1999; Moran *et al.*, 1991; Moran, 2002; Brennan *et al.*, 2004; Della Manna *et al.*, 2008).

A causa de DRFC é resultado da disfunção da ilhota pancreática causada por inflamação e fibrose por consequência de secreção exócrina viscosa (Alves *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 1999; Elder *et al.*, 2007). Acredita-se que a deficiência de insulina seja a primeira causa de DRFC, mas resistência à insulina também está presente em pacientes com FC (Costa *et al.*, 2005; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

Existe uma forte associação entre a doença pancreática exócrina e o DRFC. O acometimento exócrino inicia-se pela obstrução dos ductos pancreáticos por mucina, atrofia dos ácinos e substituição por tecido fibrogorduroso, entretanto, no meio de tamanha destruição tecidual, ainda podem ser observadas ilhotas de Langerhans totalmente normais que, ao longo do tempo, passam a apresentar depósitos de amilóide à semelhança do que é visto no DM do tipo 2 (Iannucci *et al.*, 1984; Lohr *et al.*, 1989; Della Manna *et al.*, 2008).

Muitas particularidades da FC influenciam no início e no curso dessa forma de DM, incluindo: desnutrição, infecções agudas e crônicas, gasto energético elevado, má absorção de nutrientes, trânsito intestinal anormal e disfunção hepatobiliar (Moran *et al.*, 1999; Della Manna *et al.*, 2008).

A fisiopatologia do DRFC difere da Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2), sendo classificado pela Academia Americana de Diabetes como “outros tipos de diabetes: causado por lesão do pâncreas exócrino” (Costa *et al.*, 2005; Rozov *et al.*, 2006).

Na FC, o metabolismo da glicose é influenciado pela desnutrição, infecções crônicas e agudas, aumento do metabolismo basal, deficiência de glucagon, disfunção de polipeptídeos pancreáticos, alteração do *clearance* da insulina, má absorção e alterações no trânsito intestinal, disfunção hepática e aumento do esforço respiratório (Marshall *et al.*, 2005; Lombardo *et al.*, 2003; Lanng, 2001; Alves *et al.*, 2007).

As alterações no metabolismo da glicose nos pacientes com FC podem ser didaticamente classificadas em: (1) intolerância à glicose, (2) diabetes sem hiperglicemia de jejum, (3) diabetes com hiperglicemia em jejum, e (4) diabetes intermitente, ocorrendo durante períodos de infecções, uso de nutrição enteral e corticoterapia (Moran *et al.*, 1999; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

1.2.3. Causas da DRFC

1.2.3.1. Insulinopenia

Acredita-se que a perda da função das células Beta produtoras de insulina causada por destruição progressiva na estrutura da ilhota pancreática seja uma das causas principais de DRFC. Alguns investigadores relatam redução significativa na área superficial de células beta nas ilhotas de pacientes com DRFC comparado a pacientes com FC não diabéticos (Costa *et al.*, 2005; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

As alterações do canal de cloro levam à hiperviscosidade da secreção ductal pancreática, causando lesões obstrutivas, infiltração gordurosa, fibrose progressiva das ilhotas e redução da secreção de insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático (Lombardo *et al.*, 2003; Dobson *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2007).

O acúmulo de substância amilóide dentro das células beta, presente nos pacientes com FC e diabetes e ausente naqueles com FC não diabéticos, contribui para a insulinopenia devido ao seu efeito citotóxico e limitador da secreção de insulina (Brennan *et al.*, 2004; Mackie *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2007).

A diminuição da secreção insulínica é associada à insuficiência pancreática exógena (Brennan *et al.*, 2004; Moran, 2002; Alves *et al.*, 2007).

A patogênese subjacente do desenvolvimento gradual da insulinopenia se deve, principalmente, à perda gradual de grande quantidade de células beta, mas outros fatores também são importantes. A grande maioria dos pacientes com FC apresenta insuficiência pancreática exógena. As ilhotas de Langerhans são preservadas inicialmente, contudo, com a idade, haverá menos tecido acinar e as ilhotas existirão em maiores ou menores grupos

fragmentados separados pelo tecido fibroso ou adiposo. A diminuição da função nas células das ilhotas resulta primeiramente da perda de ambas as células (Beta e Alfa), mas a função endócrina anormal também pode ser causada por uma degeneração no suprimento de sangue, uma infiltração inflamatória geralmente com predominância dos eosinófilos e, hipoteticamente, distúrbio da função parácrina entre as células das ilhotas (Lanng, 2001; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

1.2.3.2. Resistência à insulina

A resistência à insulina pode ser causada por alterações na proteína transportadora de glicose 4 (Glucose Transporter 4, GLUT-4). A translocação da GLUT-4 no compartimento intracelular para superfície é necessária para o transporte normal de glicose para dentro da célula. Há indícios de que anormalidades nessa proteína possam alterar a translocação da GLUT-4 do meio intracelular para membrana plasmática, contribuindo para a resistência insulínica (Hardin *et al.*, 2001; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

O melhor método para avaliar a resistência insulínica é a técnica da hiperinsulinemia euglicêmica, que consiste na infusão simultânea de insulina e glicose. Se a produção hepática de glicose for inibida pela infusão de insulina, então a quantidade de glicose exógena necessária para manter a euglicemia será um reflexo da sensibilidade periférica tissular à insulina (Alves *et al.*, 2007; Brennan *et al.*, 2004; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

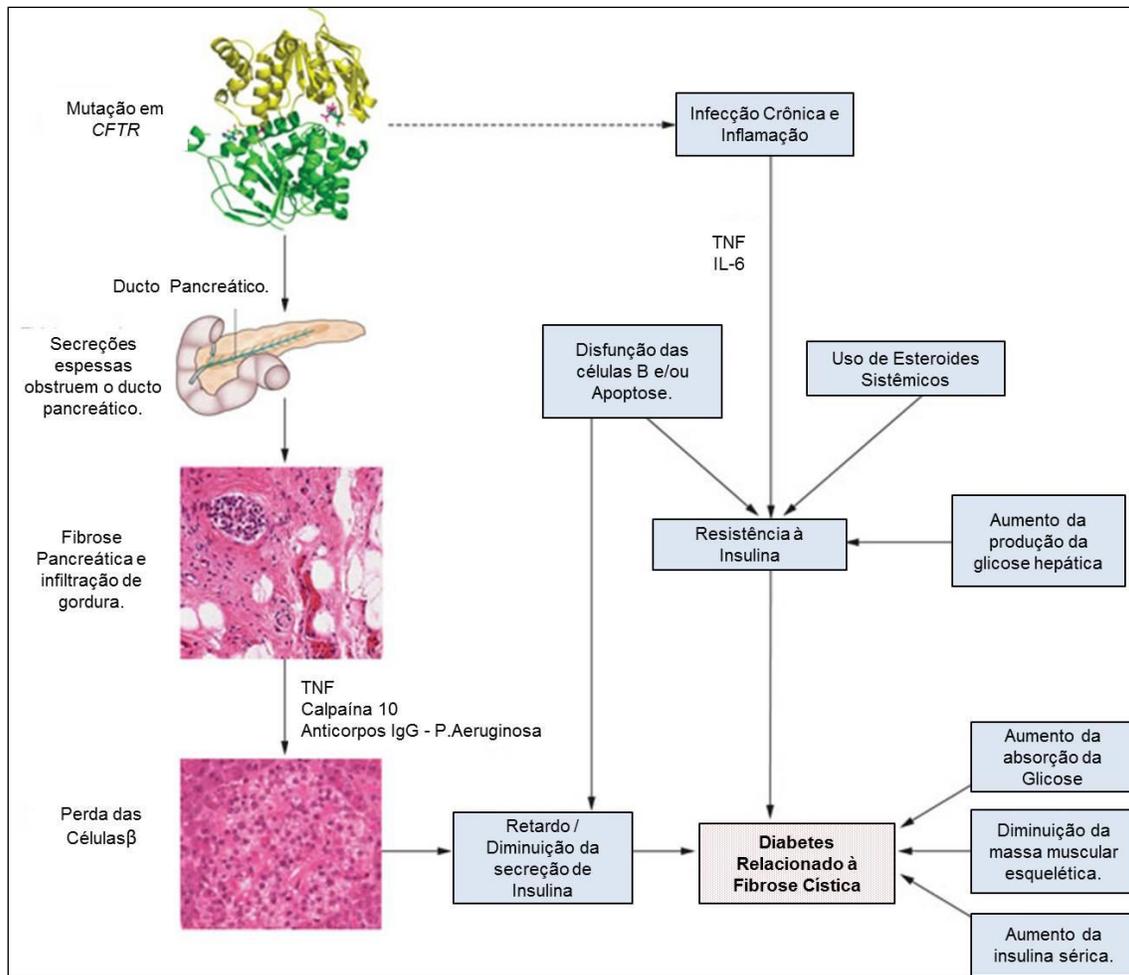


Figura 10. Mecanismos propostos para a fisiopatologia da DRFC (adaptado de Rana *et al.*, 2012).

1.2.4. Principais Complicações

Um estudo mostrou sobrevida de 60% aos 30 anos de idade em pacientes com FC sem diabetes, e 25% em pacientes com DRFC (Hardin e Moran, 1999). Além de um risco de mortalidade 6 vezes maior do que o de indivíduos com FC sem diabetes (Brennan *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2007).

O surgimento do DM parece acrescentar maior gravidade à doença fibrocística.

Entre as complicações do DRFC, as nutricionais e respiratórias são as mais importantes, a perda de peso, sem explicação, é o sinal clínico mais frequentemente informado pelos pacientes antes do diagnóstico confirmatório do DRFC. Os pacientes com DRFC apresentam pior função pulmonar e maior prevalência de bactérias patogênicas.

Complicações microvasculares como retinopatia (incluindo neovascularização e cegueira), nefropatia (com aumento na excreção de albumina e insuficiência renal) e neuropatia são relatadas na DRFC (Costa *et al.*, 2005; Brennan *et al.*, 2006; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

Existem poucos relatos de complicações macrovasculares. Possíveis explicações incluem: baixa expectativa de vida, menor incidência de dislipidemia e hipertensão e insulinoopenia (Alves *et al.*, 2007). É recomendado começar a fazer exames anuais para complicações microvasculares incluindo exames nos olhos e pés, bem como pressão sanguínea e exames de albuminúria, quando o diagnóstico de DRFC for confirmado (Costa *et al.*, 2005; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

1.2.5. Diagnóstico

A sintomatologia clássica da diabetes pode não ser reconhecida, uma vez que sintomas como letargia, fraqueza, fadiga, dificuldade na manutenção do peso, desidratação e piora inexplicável da função pulmonar podem ser também manifestações da doença pulmonar e infecções (Moran *et al.*, 1999; Moran., 2002; Della Manna *et al.*, 2008).

Sempre que um paciente com FC apresentar dificuldades na manutenção do peso, a investigação de DM deverá ser realizada (Della Manna *et al.*, 2008).

O consenso em diabetes da Cystic Fibrosis Foundation recomenda pesquisa anual dos distúrbios do metabolismo glicêmico em todo paciente portador de FC por meio da coleta de glicemia ao acaso, principalmente após as refeições, glicemia de jejum e complementação com o teste de tolerância oral à glicose (OGTT) em alguns casos, considerando-se a baixa sensibilidade e especificidade da glicemia de jejum (National Diabetes Data Group, 1979; Della Manna *et al.*, 2008).

A classificação das categorias de tolerância à glicose é feita com base na presença ou na ausência da glicemia de jejum diabética (≥ 126 mg/dL), confirmada em pelo menos duas ocasiões diferentes, assim como na glicemia de duas horas do OGTT (Hardin e Moran, 1999; Moran *et al.*, 1999; Della Manna *et al.*, 2008).

Consequentemente, foram reconhecidas duas categorias de DM na FC: o DM relacionado à FC sem hiperglicemia de jejum (DRFC sem HJ) e o DM relacionado à FC com hiperglicemia de jejum (DRFC com HJ). A hiperglicemia de jejum pode estar presente o tempo todo (DRFC crônica) ou somente em situações de descompensação aguda (DRFC intermitente) (Moran *et al.*, 1999; Della Manna *et al.*, 2008).

Devido à apresentação clínica ser frequentemente insidiosa e o tratamento inicial poder prevenir a deterioração clínica associada com a ocorrência de diabetes, exames sistemáticos são recomendados a partir dos 14 anos de idade nos pacientes com FC. Ferramentas viáveis incluem exames de glicose em jejum, hemoglobina glicada (HbA1c) e teste oral de tolerância à glicose (OGTT) (Costa *et al.*, 2005; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

Tem sido proposto que a combinação de concentração de insulina elevada, hemoglobina glicada alta, presença de sintomas de hiperglicemia e perda inexplicável de

peso, podem ter alta sensibilidade para identificar pacientes com DRFC (Costa *et al.*, 2005; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

A dosagem da hemoglobina glicada, realizada trimestralmente, é útil para monitoração do DRFC já instalada (Brennan *et al.*, 2006) O diagnóstico do DRFC agrava ainda mais a dificuldade de conviver com a FC, devido à necessidade do uso de insulina injetável, monitoração da glicemia por capilar, restrições alimentares e hospitalizações por descontrole metabólico. O apoio multidisciplinar é fundamental para auxiliar na aceitação desse novo problema (Alves *et al.*, 2007; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

O diagnóstico dos variados graus de intolerância à glicose é baseado na glicemia em jejum ou no teste de tolerância oral à glicose (OGTT). Embora a glicemia de jejum seja mais fácil de ser realizada, sua sensibilidade é baixa, porque, como visto, existem formas clínicas que não apresentam hiperglicemia em jejum (Costa *et al.*, 2005; Azzopardi *et al.*, 2003). Por isso, recomenda-se o teste de tolerância oral à glicose, como padrão ouro. Ele é realizado após a ingestão de 1,75 g/kg de glicose (máximo: 75 g), medindo a glicemia basal e após 2 h. Para realizar o teste, o paciente não deve estar sendo tratado com corticoide, nem ter tido infecções pulmonares agudas há pelo menos 1 mês (Costa *et al.*, 2005). Resultados anormais devem ser confirmados por um segundo exame, principalmente naqueles pacientes sem sintomatologia de diabetes (Mueller-Brandes *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2007).

1.2.6. Tratamento

O tratamento da DRFC visa o manejo da hiperglicemia, prevenção da hipoglicemia, otimização do estado nutricional e promoção da adaptação social e emocional. (Moran, 2002). A abordagem deve ser individualizada, com ênfase nos aspectos clínicos e de gravidade de cada caso, contando com equipe multidisciplinar. A educação, conscientização e cooperação dos pais são elementos importantes no estabelecimento de uma relação de mútua confiança, visando à terapêutica precoce e correta (Rozov, 1999; Alves *et al.*, 2007).

O tratamento para DRFC deve controlar os sintomas da diabetes e prevenir complicações (Lanng, 2001; Brennan *et al.*, 2006; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

A condução do tratamento do paciente com FC requer abordagem multiprofissional que inclui pneumologista, gastroenterologista, nutricionista, fisioterapeuta, enfermeira, psicólogo, endocrinologista, cardiologista e cirurgião de tórax, quando da indicação do transplante de pulmão (Della Manna *et al.*, 2008).

A orientação do tratamento do DRFC difere daquele do DM tipo 1 e do DM tipo 2 basicamente porque, enquanto a morbimortalidade desses últimos está associada à nefropatia e doença cardiovascular, no DRFC ela está relacionada à desnutrição e à doença pulmonar (Della Manna *et al.*, 2008).

Os objetivos do tratamento é a otimização do crescimento e do desenvolvimento, com manutenção do índice de massa corpórea (IMC) acima do percentil 25 e oferta calórica entre 10% e 40% acima das necessidades diárias recomendadas para sexo e idade. O enfoque principal no tratamento do DRFC é o manejo nutricional e o tratamento da

hiperglicemia inicialmente no período pós-prandial e, evolutivamente, também no estado de jejum (Della Manna *et al.*, 2008).

O tratamento da hiperglicemia será direcionado primeiramente ao controle pós-prandial por meio da introdução da insulinoterapia relacionada às refeições (Della Manna *et al.*, 2008).

O uso de insulina é recomendado se houver sintomas de diabetes, declínio não explicado do peso corporal ou função pulmonar (Moran *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2007; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

A DRFC não pode ser tratada só com dieta (Lanng, 2001). A insulina é o único tratamento farmacológico recomendado para pacientes com DRFC (Costa *et al.*, 2005; Milla *et al.*, 2000; Ribeiro, Lunardelli e Oliveira, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

-Analisar a associação de polimorfismos nos genes *TCF7L2* e *ADRA2A* com a gravidade clínica da Fibrose Cística.

2.2. Objetivos Específicos

-Determinar a frequência do polimorfismo rs12255372 no gene *TCF7L2* em pacientes com Fibrose Cística.

-Determinar a frequência dos polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* em pacientes com Fibrose Cística.

-Analisar o polimorfismo rs12255372 no gene *TCF7L2* e verificar associação com a Diabetes Mellitus em Pacientes com Fibrose Cística;

-Investigar a associação dos polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* com as 27 variáveis clínicas da Fibrose Cística.

**3. ARTIGO 1 – “ASSOCIATION BETWEEN THE *IVS4G>T* MUTATION IN THE
TCF7L2 GENE AND SUSCEPTIBILITY TO DIABETES IN CYSTIC FIBROSIS
PATIENTS.”**

SHORT REPORT

Open Access

Association between the IVS4G > T mutation in the *TCF7L2* gene and susceptibility to diabetes in cystic fibrosis patients

Daniela Tenório Furgeri¹, Fernando Augusto de Lima Marson², Antonio Fernando Ribeiro² and Carmen Silvia Bertuzzo^{1,3*}

Abstract

Background: Clinical complications appear to be a decisive factor for the prognosis of patients. Diabetes is an important complication of cystic fibrosis (CF). In our study we evaluated the association between the IVS4G>T mutation in the *TCF7L2* gene with the presence of diabetes in patients with CF.

Findings: We evaluated 145 patients with CF in relation to the genotype of the IVS4G>T mutation. For this, the PCR method associated with specific enzyme digestion was used. The genotypes G/G, G/T and T/T were observed to have frequencies of 54 (37.2%), 78 (53.8%) and 13 (9%), respectively. There was no association between genotype and the occurrence of diabetes among patients.

Conclusions: In our sample, no association was found between the IVS4G>T mutation in the *TCF7L2* gene and diabetes.

Keywords: rs12255372, IVS4G > T, *TCF7L2*, Cystic fibrosis, Diabetes

Findings

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is a monogenic autosomal recessive disease more common in the Caucasian population. It has the overall prevalence of 1:2500 births [1].

CF occurs due to mutations in the gene *CFTR* ("Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator") located in the 7q3.1 region, which encodes the CFTR protein. Over 1897 mutations were identified in the *CFTR* gene [2].

The disease is characterized by a higher viscosity of secretions leading to chronic obstructive pulmonary disease, recurrent respiratory tract infections, pancreatic insufficiency, increased concentration of chloride in sweat and male infertility [1].

The clinical features of CF are characterized by clinical heterogeneity; some individuals have early death, while

others survive to adulthood [3]. Clinical complications appear to be a decisive factor for the prognosis of patients. Diabetes is an important complication of CF. Diabetes risk increases with age, affecting about 25% of adolescents and 40–50% of adults with CF [4–6]. As CF's patients are now living longer, diabetes has become the most common systemic complication of CF after lung disease. Diabetes is associated with a significantly worse CF prognosis [6,7], although treatment of diabetes improves nutritional status and pulmonary function [8]. Among CF's patients, the prevalence of diabetes is approximately tenfold greater (at about one-third the age) than is seen for type 2 diabetes in the general population [6,9].

Grant et al. [10] reported on the association of a common microsatellite (DG10S478) within intron 3 of the transcription factor 7-like 2 gene (*TCF7L2*) with type 2 diabetes in an Icelandic case-control sample and replicated in two additional case-control cohorts of white patients. The noncoding single-nucleotide polymorphisms rs12255372 and rs7903146 were in strong linkage disequilibrium with DG10S478 ($r^2 = 0.95$ and

* Correspondence: bertuzzo@unicamp.br

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas, SP 13081-970, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

$r^2 = 0.78$, respectively) and showed similarly robust associations with type 2 diabetes. The authors recommended that these two single-nucleotide polymorphisms be genotyped in all attempts at replication [11].

In our study we evaluated the association of the rs12255372 polymorphism (IVS4G>T mutation) in *TCF7L2* gene with the presence of diabetes in patients with CF.

Results

This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of University of Campinas - UNICAMP (#528/2008).

The study included 145 patients with CF who are monitored by the Pediatric Pulmonology Outpatient Clinic at UNICAMP.

The genotypes G/G, G/T and T/T were observed with frequencies of 54 (37.2%), 78 (53.8%) and 13 (9%), respectively. The frequency of G allele was 0.64 and the T allele 0.36.

Of the total patients, 72 patients (49.7%) were female and 73 (50.3%) were male, diabetes mellitus was reported in 29 (20.3%) patients and 114 (79.7%) had no comorbidity; meconium ileus was diagnosed in 24 patients (16.6%) and 121 (83.4%) had no comorbidity.

The ethnicity of the patients was respectively, 136 (93.8%), 5 (3.4%) and 4 (2.8%) of Caucasoid, Negroid and mixed race.

For the sample that was screened for the F508del mutation, its frequency was: 37 (25.5%) F508del/F508del, 60 (41.4%) with one F508del allele and 48 (33.1%) patients without the F508del mutation identified.

74 patients (51%) were aged less or equal than 154 months and 71 patients (49%) greater than 154 months.

Association between genotype of the IVS4G>T mutation and the development of diabetes and the presence of meconium ileus (Tables 1, 2) was not found. When the variable presence of the F508del mutation was introduced, an association was still not found in our sample (Tables 3,4).

Discussion

Florez et al. (2006) [11], examined whether the two most strongly associated variants (rs12255372 and rs7903146) predict the progression to diabetes in 3,548 persons with impaired glucose tolerance who were enrolled in the Diabetes Prevention Program, in which lifestyle intervention or treatment with metformin was compared with placebo. The data found showed that the risk alleles in rs7903146 and rs12255372 predict the risk of diabetes prospectively, beyond that conferred by the clinical risk factors.

In 2009, Blackman et al., [6] had already tested whether a family history of type 2 diabetes affected

Table 1 Association IVS4G>T mutation with clinical variables in cystic fibrosis patients followed at the Pediatric Clinic at UNICAMP distribution without the mutations in the CFTR gene

Sex	Male	Female	Chi-square	p-value
G/G	28 (51.9%)	26 (48.1%)	0.144	0.93
G/T	39 (50%)	39 (50%)		
T/T	7 (53.8%)	6 (46.2%)		
Diabetes	No	Yes		
G/G	39 (72.2%)	15 (27.8%)	3.018	0.221
G/T	64 (84.2%)	12 (15.8%)		
T/T	11 (84.6%)	2 (15.4%)		
Meconium ileus	No	Yes		
G/G	47 (87%)	7 (13%)	1.014	0.602
G/T	64 (82.1%)	14 (17.0%)		
T/T	10 (76.9%)	3 (23.1%)		
Age	≤ 154 months	> 154 months		
G/G	28 (51.9%)	26 (48.1%)	2.141	0.343
G/T	37 (47.4%)	41 (52.6%)		
T/T	9 (69.2%)	4 (30.8%)		

diabetes risk in CF patients in 539 families in the CF Twin and Sibling family-based study. 998 patients were evaluated from the family-based study and 802 unrelated CF patients in an independent case-control study. Family history of type 2 diabetes was shown to increase the risk of diabetes in CF (OR 3.1; $p = 0.0009$). A variant in *TCF7L2* associated with type 2 diabetes (the T allele at rs7903146) was associated with diabetes in CF in the family study ($p = 0.004$) and in the case-control study ($p = 0.02$; combined $p = 0.0002$). In the family-based

Table 2 Association IVS4G>T mutation in TCF7L2 gene after genotypic groupings with clinical variables in cystic fibrosis patients followed at the Pediatric Clinic at UNICAMP distribution without the mutations in the CFTR gene

Sex	Male	Female	Chi-square	p-value
G/G	26 (48.1%)	28 (51.9%)	0.078	0.864
G/T and T/T	46 (50.5%)	45 (49.5%)		
Diabetes	No	Yes		
G/G	39 (72.2%)	15 (27.8%)	3.017	0.091
G/T and T/T	75 (84.3%)	14 (15.7%)		
Meconium ileus	No	Yes		
G/G	47 (87%)	7 (13%)	0.802	0.489
G/T and T/T	74 (83.4%)	7 (18.7%)		
Age	≤ 154 months	> 154 months		
G/G	28 (51.9%)	26 (48.1%)	0.23	1
G/T and T/T	46 (50.5%)	45 (49.5%)		

Table 3 Association IVS4G>T mutation in TCF7L2 gene, distributed by genotype for the mutation in the CFTR gene delF508 with clinical variables in cystic fibrosis patients followed at the Pediatric Clinic at UNICAMP with the distribution by mutations in the CFTR gene

F508del	Sex	Male	Female	Chi-square	p-value
-/-	G/G	8 (53.3%)	7 (46.7%)	0.756	0.685
	G/T	12 (42.9%)	16 (57.1%)		
	T/T	3 (60%)	2 (40%)		
F508del/-	G/G	13 (48.1%)	14 (51.9%)	0.932	0.627
	G/T	17 (60.7%)	11 (39.3%)		
	T/T	3 (60%)	2 (40%)		
F508del/F508del	G/G	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0.176	0.916
	G/T	1 (33.3%)	2 (66.7%)		
	T/T	16 (43.2%)	21 (56.8%)		
F508del	Diabetes	No	Yes		
-/-	G/G	12 (80%)	3 (20%)	1.356	0.508
	G/T	21 (77.8%)	6 (22.2%)		
	T/T	5 (100%)	-		
F508del/-	G/G	19 (70.4%)	8 (29.6%)	2.858	0.24
	G/T	24 (88.9%)	3 (11.1%)		
	T/T	4 (80%)	1 (20%)		
F508del/F508del	G/G	8 (66.7%)	4 (33.3%)	2.042	0.36
	G/T	18 (86.4%)	3 (13.6%)		
	T/T	29 (78.4%)	8 (21.6%)		
F508del	meconium ileus	No	Yes		
-/-	G/G	15 (100%)	-	2.286	0.319
	G/T	25 (89.35)	3 (10.7%)		
	T/T	5 (100%)	-		
F508del/-	G/G	22 (81.5%)	5 (18.5%)	0.073	0.964
	G/T	22 (78.6%)	6 (21.4%)		
	T/T	4 (80%)	1 (20%)		
F508del/F508del	G/G	10 (83.3%)	2 (16.7%)	3.335	0.189
	G/T	17 (77.3%)	5 (22.75)		
	T/T	1 (33.3%)	2 (66.7%)		
F508del	Age	≤ 154 months	> 154 months		
-/-	G/G	4 (26.7%)	11 (73.3%)	0.813	0.666
	G/T	6 (21.4%)	22 (78.6%)		
	T/T	2 (40%)	3 (60%)		
F508del/-	G/G	15 (55.6%)	12 (44.45)	2.641	0.267
	G/T	12 (42.9%)	16 (57.1%)		
	T/T	4 (80%)	1 (20%)		
F508del/F508del	G/G	9 (75%)	3 (25%)	1.37	0.504
	G/T	19 (86.4%)	3 (13.6)		
	T/T	3 (100%)	-		

(-) absence of F508del mutation.

Table 4 Association IVS4G > T mutation in TCF7L2 gene after genotypic groupings, distributed by genotype for the mutation in the CFTR gene delF508 with clinical variables in cystic fibrosis patients followed at the Pediatric Clinic at UNICAMP with the distribution by mutations in the CFTR gene

F508del	Sex	Male	Female	Chi-square	p-value
-/-	G/G	8 (53.3%)	7 (46.7%)	0.257	0.613
	G/T and T/T	15 (45.5%)	18 (54.5%)		
F508del/-	G/G	13 (48.1%)	14 (51.9%)	0.931	0.335
	G/T and T/T	20 (60.6%)	13 (39.4%)		
F508del/F508del	G/G	5 (41.7%)	7 (58.3%)	0.018	0.893
	G/T and T/T	11 (44%)	14 (54%)		
F508del	Diabetes	No	Yes		
-/-	G/G	12 (80%)	3 (20%)	0.01	0.919
	G/T and T/T	26 (81.3%)	6 (18.8%)		
F508del/-	G/G	19 (70.4%)	8 (29.6%)	2.652	0.103
	G/T and T/T	28 (87.5%)	4 (12.5%)		
F508del/F508del	G/G	8 (66.7%)	4 (33.3%)	1.437	0.231
	G/T and T/T	21 (84%)	4 (16%)		
F508del	Meconium ileus	No	Yes		
-/-	G/G	15 (100%)	-	1.455	0.228
	G/T and T/T	30 (90.9%)	3 (9.1%)		
F508del/-	G/G	22 (81.5%)	5 (18.5%)	0.067	0.795
	G/T and T/T	26 (78.8%)	7 (21.2%)		
F508del/F508del	G/G	10 (83.3%)	2 (16.7%)	0.566	0.452
	G/T and T/T	18 (72%)	7 (28%)		
F508del	Age	≤ 154 months	> 154 months		
-/-	G/G	4 (26.7%)	11 (73.3%)	0.032	0.857
	G/T and T/T	8 (24.2%)	25 (75.8%)		
F508del/-	G/G	15 (55.6%)	12 (44.4%)	0.297	0.586
	G/T and T/T	16 (48.5%)	17 (51.5%)		
F508del/F508del	G/G	9 (75%)	3 (25%)	1.009	0.315
	G/T and T/T	22 (88%)	3 (12%)		

(-) absence of F508del mutation.

study, variation in *TCF7L2* gene increased the risk of diabetes about threefold (HR 1.75 per allele, 95% CI 1.3–2.4; $p = 0.0006$), and decreased the mean age at diabetes diagnosis by 7 years. In CF patients not treated with systemic glucocorticoids, the effect of *TCF7L2* was even greater (HR 2.9 per allele, 95% CI 1.7–4.9, $p = 0.00011$). A genetic variant conferring risk for type 2 diabetes in the general population is a modifier of risk for diabetes in CF.

Given these results, it became interesting to evaluate the other polymorphism, rs12255372 that is also related to a risk of diabetes among CF's patients. Our analysis, however, found no such correlation.

The absence of a relationship may be due to the sample size, but since this correlation is of great importance, it should have appeared even in a small sample. In any case, with an analysis of a larger number of patients it is

possible that a relationship between the studied polymorphism and CF risk can still be evidenced.

Patients and methods

Patients were included in the study from the Pediatric Clinic at the Faculty of Medical Sciences of UNICAMP. The sample size calculation was performed by G-POWER program version 3.1 (using 0.05 alpha, 0.8 beta and W size effect of 0.3). To have the statically power to all analyses using chi square test we need a population size of 143 patients. All patients were confirmed as having CF through two positive sodium and chloride sweat tests (value greater than 60 mmol/L) and by analysis of differential membrane epithelium of the intestine by the dosage of active CFTR through the Ussing chamber. The identification of mutations in the *CFTR* gene was performed in the laboratory of

Molecular Genetics, FCM/UNICAMP, which has the routine analysis tests for major mutations found in the population of Brazil, which are: F508del, G542X, R1162X, N1303K, G551D and N1303K. Of the patients initially included in the survey, only those without clinical data for statistical analysis and/or those who did not sign the informed consent were excluded.

The DNA was obtained by the extraction technique of phenol chloroform from 8 mL of venous blood. The concentration of DNA used for analysis was 50 ng/mL. Genotyping was performed using the PCR technique associated with specific enzyme digestion.

The PCR reaction had a 25 µL final volume with 100 ng of DNA, 1 µM of each primers, 200 mM deoxynucleotide triphosphates, 1.3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris - HCl (pH 8.4 at 25°C), 0.1% Triton X-100 and 0.35 U Taq DNA polymerase. A pair of primers were designed and optimized to amplify the region of the mutation IVS4G > T, resulting in amplification of 337 bp (S, 5'-CTGGAACTAAGGCGTGAGG-3', AS, 5'-TTGTTGAGCTTTACTGAGAT-3'). The procedure for the thermal cycling consisted of initial denaturation at 94°C for 7 min, subsequent denaturation at 94°C for 30', annealing at 56°C for 45', and extension at 72°C for 2 min, repeated for 35 cycles, followed by a final extension at 72°C for 7 min.

The product from the PCR had a size of 337 bp and after digestion by the restriction enzyme Tsp509I, fragments of 143 bp + 99 + 95 - G/G genotype, fragments of 126 + 17 + 99 + 95 bp - T/T genotype and fragments of 143 + 126 + 99 + 95 + 17 bp - genotype G/T were found.

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v.17.0 and Open Epi v.5.0 program. Data was compared by different tests according to data distribution. Initially, data was compared the chi square and Fisher exact test. For all the analyses we adopted the value of $p = 0.05$.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DTF carried out the molecular genetic analysis, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. FALM participated in the design of the study and performed the statistical analysis. AFR and CSB conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

BioEdit is acknowledged for re-reading the manuscript. Fapesp to financial support. And the <http://www.laboratoriomultiusuario.com.br> to possibility the study.

Author details

¹Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ²Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ³Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária, Campinas, SP 13081-970, Brazil.

Received: 4 May 2012 Accepted: 19 September 2012
Published: 10 October 2012

References

1. Tzetis M, Efthymiadou A, Doudounakis S, Kanavakis E: **Qualitative and quantitative analysis of mRNA associated with four putative splicing mutations (621 + 3A -> G, 2751 + 2T -> A, 296 + 1G -> C, 1717 - 9T -> C - D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the CFTR gene.** *Hum Genet* 2001, **109**(6):592-601.
2. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium - CFGAC. Disponível em: <http://www.geneticsickkids.on.ca/cftr>. Accessed November 22, 2012.
3. Simmonds NJ, MacNeil SJ, Cullinan P, Hodson ME: **Cystic fibrosis and survival to 40 years: a case-control study.** *Eur Respir J* 2010, **36**(6):1277-1283.
4. Moran A, Hardin D, Rodman D, Allen HF, Beall RJ, Borowitz D, Brunzell C, Campbell PW 3rd, Chesrown SE, Duchow C, Fink RJ, Fitzsimmons SC, Hamilton N, Hirsch I, Howenstine MS, Klein DJ, Madhun Z, Pencharz PB, Quittner AL, Robbins MK, Schindler T, Schissel K, Schwarzenberg SJ, Stallings VA, Zipf WB: **Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: a consensus conference report.** *Diabetes Res Clin Pract* 1999, **45**:61-73.
5. Mackie AD, Thornton SJ, Edenborough FP: **Cystic fibrosis-related diabetes.** *Diabet Med* 2003, **20**:425-436.
6. Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, Naughton KM, Wright FA, Drumm ML, Knowles MR, Cutting GR: **A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis.** *Diabetologia* 2009, **52**(9):1858-1865.
7. Milla CE, Warwick WJ, Moran A: **Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**:891-895.
8. Mohan K, Israel KL, Miller H, Grainger R, Ledson MJ, Walshaw MJ: **Long-term effect of insulin treatment in cystic fibrosis-related diabetes.** *Respiration* 2008, **76**:181-186.
9. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Eberhardt MS, Flegal KM, Engelgau MM, Saydah SH, Williams DE, Geiss LS, Gregg EW: **Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002.** *Diabetes Care* 2006, **29**:1263-1268.
10. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K: **Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes.** *Nat Genet* 2006, **38**:320-323.
11. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D: **Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program.** *N Engl J Med* 2006, **355**(3):241-250.

doi:10.1186/1756-0500-5-561

Cite this article as: Furgeri et al.: Association between the IVS4G > T mutation in the TCF7L2 gene and susceptibility to diabetes in cystic fibrosis patients. *BMC Research Notes* 2012 5:561.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4. ARTIGO 2 – “ADRA2A IS A CYSTIC FIBROSIS MODIFIER GENE.”



ADRA2A IS A CYSTIC FIBROSIS MODIFIER GENE

MARSON F.A.L.^{1,2*#}, REZENDE L.M.^{1#}, FURGERI D.T.¹, RIBEIRO A.F.², RIBEIRO J.D.² AND BERTUZZO C.S.¹

¹Department of Genetics, Medical Sciences Faculty, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Pediatrics, Medical Sciences Faculty, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil.

*Corresponding Author: Email- fermandolimmarson@hotmail.com

#Authors Contributed Equally

Received: February 16, 2013; Accepted: February 25, 2013

Abstract-

Background: Cystic fibrosis (CF) is an autosomal disease with characteristics of a complex disease. Understanding *ADRA2A* polymorphisms are important to elucidate clinical variability that is encountered in inflammatory diseases including CF, for which diabetes is an important comorbidity beyond the primary inflammatory pulmonary disease.

Method: We included 176 CF patients. The rs553668 and rs10885122 *ADRA2A* gene polymorphisms were screened by ARMS-PCR. A genotypic comparison was performed with 27 CF clinical variables and *CFTR* mutations.

Results: Clinical associations were found with the categorical variables: race [rs553668 polymorphism without taking the *CFTR* gene into account ($p=0.002$); haplotype group, without taking the *CFTR* gene into account ($p=0.014$)], meconium ileus [rs553668 polymorphism without taking the *CFTR* gene into account ($p=0.030$) and patients with two *CFTR* mutations ($p=0.0012$)] and BMI [rs553668 polymorphism in patients with two *CFTR* mutations ($p=0.014$)]. The association with numerical data was positive for age of diagnosis [rs553668 polymorphism without taking *CFTR* mutations into account ($p=0.022$); the Bhalla score [rs553668 polymorphism in patients with two *CFTR* mutations ($p=0.014$); and the Shwachman-Kulczycki score [rs553668 polymorphism ($p=0.008$) and haplotype ($p=0.050$) in patients with two *CFTR* mutations].

Conclusion: The rs553668 and rs10885122 *ADRA2A* gene polymorphisms are modifiers of CF severity.

Keywords- Cystic fibrosis, polymorphisms, *ADRA2A*, *CFTR*, genotype, phenotype, variability, lung disease, modifier gene

Citation: Marson F.A.L., et al. (2013) *ADRA2A* is a Cystic Fibrosis Modifier Gene. International Journal of Genetics, ISSN: 0975-2862 & E-ISSN: 0975-9158, Volume 5, Issue 1, pp.-125-131.

Copyright: Copyright©2013 Marson F.A.L., et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Background

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal disease that has characteristics of a complex disease. CF clinical modulations are associated with the environment and modifier genes [1-3]. The environment is a factor that cannot be controlled for statistical analysis. However, modifier genes are study targets that enable greater understanding of clinical disease variability, especially in regard to the lung disease.

Our group studied CF severity in association with several modifier genes including polymorphisms in the following genes: *MBL-2*, *TGF- β 1*, *CD14* [4], *GSTM1*, *GSTT1* [5], *ACE* [6], *ADRB2* [7] and *TCF7L2* [8]. These polymorphisms are associated with clinical variables including lung and digestive disease.

In CF, clinical variability is associated with clinical variables; however, much remains to be analyzed, and modifier genes that are associated with the immune response have been a target for studying genetic modulation and identifying new therapeutics [1-3]. Among these, the 2-adrenergic receptor alpha (*ADRA2A*) gene has been studied.

The *ADRA2A* gene region 10q24-q25 encodes a protein with 450 amino acids, which is known as alpha-2A adrenergic receptor (α 2-AR). Adrenergic receptors are part of a family of G protein-coupled receptors that are stimulated by catecholamines such as epinephrine and norepinephrine. Generally with stimuli, adrenergic receptors activate G proteins that will stimulate enzymes such as adenylyl cyclase and phospholipase C to induce second messenger production including cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP) or inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), diacylglycerol (DAG) and Ca^{2+} . Conversely, the α 2-AR G-protein coupled receptor inhibits adenylyl cyclase and subsequent cAMP formation [9,10].

The α 2-AR is found in adrenergic cells and is highly expressed in sympathetic nerve center outputs, the cerebral cortex, the hippocampus, the septum, the amygdaloid, hypothalamic nuclei, the umbilical cord, the spine, pancreatic islets, platelets and immune cells (macrophages, polymorphonuclear cells and T lymphocytes) [10-13]. The α 2-AR protein reduces sympathetic tone and norepinephrine levels, blood pressure and heart rate, thus providing sedation and analgesia. The α 2-AR protein is also involved in glucose and

lipid metabolism, body temperature regulation, platelet aggregation, proinflammatory cytokine production, cognition and behavior [14,15].

Studies have correlated $\alpha 2$ -AR receptor expression with diabetes mellitus risk, pulmonary inflammatory process intensity during bacterial infections and allergic asthma-related bronchoconstriction [15-17]. In this context, studying ADRA2A polymorphisms is important to elucidate clinical variability in inflammatory diseases including CF, for which diabetes is an important comorbidity beyond the inflammatory pulmonary disease.

The aim of this study was to investigate the association of 27 CF clinical variables with ADRA2A polymorphisms.

Methods

Cross-sectional studies were conducted in a university center for CF care between 2012 and 2013. CF diagnosis was confirmed in patients with two tests that gave sweat sodium and chloride values greater than 60 mEq/L.

In a cohort of patients we identified two mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) gene. No patient had received the neonatal CF screening test.

In total, 215 patients were selected for the study. Of these, 176 were included, and 39 patients who did not have clinical data for statistical analysis and had not signed the consent form were excluded.

Patient DNA was obtained by phenol-chloroform extraction.

The DNA concentration used for analysis was 50 ng/mL, which was evaluated using a GE NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA).

Clinical Markers of Disease Severity

The following clinical severity markers were employed: clinical scores (Shwachman-Kulczycki, Kanga and Bhalla) [18], body mass index (BMI) (for patients older than 19, the BMI= weight/(height)² formula was used; for the remaining patients, the WHO ANTHRO (children under 5 years old) and WHO ANTHRO PLUS (children 5-19 years old) programs were used [19,20]), patient age (≤ 154 and > 154 -month-old age groups), age at diagnosis (sodium and chloride levels with altered perspiration ≤ 24 and > 24 months), first clinical symptoms (digestive ≤ 3 and > 3 months; pulmonary ≤ 6 and > 6 months), 1st *Pseudomonas aeruginosa* colonization (≤ 31 and > 31 months), sputum microorganism presence (*P. aeruginosa* mucoid (PAM) and non-mucoid (PANM), *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* and *Staphylococcus aureus*), transcutaneous hemoglobin oxygen saturation and spirometry.

Spirometry was performed in patients who were at least 7 years old with the CPFS/D spirometer (MedGraphics, Saint Paul, Minnesota, USA). Data were recorded using PF BREEZE software version 3.8B for Windows 95/98/NT, and the following markers were included: forced vital capacity [FVC(%)], forced expiratory volume in the first second [FEV₁(%)], the ratio between FEV₁ and FVC(%) [FEV₁/FVC(%)], and forced expiratory flow between 25 and 75% of the FVC [FEF₂₅₋₇₅(%)].

The analyzed comorbidities were nasal polyps, osteoporosis, meconium ileus, diabetes mellitus, and pancreatic insufficiency.

This study was approved by the Institutional Ethics Committee from the University of Campinas Medical Faculty (#528/2008), and all of the patients signed a consent form before beginning the study.

CFTR Mutation Determination

CFTR mutation determination was performed by polymerase chain reaction (PCR) (F508del mutation) and the fragment length polymorphism method (G542X, R1162X, R553X, G551D and N1303K). Some mutations in CF patients were obtained by sequencing or MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) analysis, S4X, 2183A>G, 1717G>A and I618T. For sequencing and MLPA, we used the same MegaBACE 1000® (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA). The CFTR genotype was used as a correction factor for statistical analysis. All of the mutations identified were included in class one, two or three of the CFTR gene. Other mutations that were as class IV (P205S e R334W) were not included in the statistical analysis. For more details see the session results.

ADRA2A Polymorphism Determination

To determine the genotype of the rs553668 and rs10885122 polymorphisms in the ADRA2A gene, the amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was used because it can specifically determine single sequence polymorphisms with the same sensibility and specificity as restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) [21]. To assess rs553668 polymorphisms the following primers were used: 3'- CCA AGG CCA GGA TTT CAA CA -5' (common primer), 3'- CCC AAC TCT CTC TCT CTT TTT TG -5' and 3'- CCC AAC TCT CTC TCT TTT TA -5' (specific primers). The following primers were used to assess rs10885122 polymorphisms: 3'- TTC CCT GCT CAG AAA CAT CC -5' (common primer), 3'- GTA TCA ACA GGT TTC ACA AGG -5' and 3'- GTA TCA ACA GGT TTC ACA AGT -5' (specific primers).

The rs553668 PCR fragment was 152 base pairs and the rs10885122 PCR fragment was 221 base pairs.

Polymorphism PCR was performed with bidistilled water, 10x Taq buffer with (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ (25 mM), dNTP (25 mM each), primers (0.2 pmol of each primer), Taq polymerase (5U) and genomic DNA (50 ng/mL).

The annealing temperatures for rs553668 and rs10885122 were 56°C and 60°C, respectively.

The reaction was analyzed on a polyacrylamide gel (12%) at 180 V for 4 hours. The gel was stained in ethidium bromide solution and visualized on the Typhoon™ scanner (GE Healthcare, Wisconsin, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software v.17.0 (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL), Epi Info v.6.0 [22] and R version 2.12 (Comprehensive R Archive Network, 2011). Sample statistical power calculations were performed with GPower 3.0.3.1 software [23]; statistical power for the analysis was above 80%.

The data were compared using the χ^2 and Fisher exact tests for categorical variables and the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for numerical variables.

The rs553668 and rs10885122 polymorphisms were compared directly with the variables according to results session. All of the associations for the analyzed haplotypes were performed considering whether the genotypes were heterozygous for either polymorphism according to results session. For additional details, consult [Fig-1].

Because of the high standard deviation in the patient data distribu-

tion several variables were categorized into classes based on time (short or long) and severity (minor or severe) including patient age, age at diagnosis, onset of pulmonary and digestive symptoms and time before *P. aeruginosa* isolation.



Fig. 1- Haplotype groups for the rs10885122 and rs553668 ADRA2A gene polymorphisms.

[Fig-1] demonstrates the high prevalence for the heterozygous ADRA2A gene rs10885122 and rs553668 polymorphism haplotype and polymorphism localizations in the ADRA2A gene. All of the possible polymorphism combinations are demonstrated; patient number (N) and frequency (%) in each group.

To avoid spurious data because of multiple problematic tests [24], the significance level α was adjusted using the Bonferroni correction test ($\alpha_{corrected} = 0.05/\text{number of tests}$).

The analyses were performed using two cohorts. The first cohort included all of the CF patients (176 patients), and second cohort contained patients with two CFTR gene mutations (78 patients). The latter was the main cohort that was used to analyze modifier gene influence associated with CF clinical variations.

Results

In total, 176 CF patients were included in the study. All of the CF patient clinical features are demonstrated in [Table-1]. Characterization of the ADRA2A gene polymorphism and CFTR mutation genotypes among the CF patients is shown in [Table-2]. The ADRA2A gene rs553668 and rs10885122 polymorphism haplotype groups are described in [Table-3]. There was prevalence to the GA/GT group, which included 79 (54.86%) patients.

The association of the ADRA2A gene rs10885122 and rs553668 polymorphisms with CF patient clinical variables distributed by CFTR mutation and haplotype are described in [Table-4].

The association of CF severity with rs553668 polymorphism and ADRA2A gene haplotype in regard to the categorical variable with a positive corrected p-value is demonstrated in [Table-5].

The association of age of diagnosis and the Shwachman-Kulczycki score with ADRA2A gene rs553668 polymorphism and CF haplotype is demonstrated in [Table-6].

Associations were found with the categorical variables: race [rs553668 polymorphism without taking the CFTR gene into account ($p = 0.002$); haplotype group without taking the CFTR gene into account ($p = 0.014$)], meconium ileus [rs553668 polymorphism without taking the CFTR gene into account ($p = 0.030$), and patients with two CFTR mutations ($p = 0.0012$)], BMI [rs553668 polymorphism in patients with two CFTR mutations ($p = 0.014$)], which are

described in [Table-4] and [Table-5]. The association with numerical data was positive for age of diagnosis [rs553668 polymorphism without taking the CFTR mutation into account ($p = 0.022$)]; the Bhalla score [rs553668 polymorphism in patients with two CFTR mutations ($p = 0.014$)]; and the Shwachman-Kulczycki score [rs553668 polymorphism ($p = 0.008$) and haplotype ($p = 0.050$) in patients with two CFTR mutations].

Table 1- Clinical features of Cystic Fibrosis patients included in the study

Variable	mean \pm SD (range)
Sex - male	48% (86) [#]
Caucasian	91.5% (161) [#]
Age	208.64 \pm 13.85 months (7-833 months) [*]
BMI - thinness and accentuated thinness	20.69% (36) [#]
One Class I, II or III identified mutation	27.93% (49) [#]
Two Class I, II or III identified mutations	43.31% (76) [#]
First clinical manifestation	35.44 \pm 8.52 months (0-720 months) [*]
Age at diagnosis	91.93 \pm 12.70 months (0-720 months) [*]
Digestive symptom onset	41.49 \pm 9.10 months (0-720 months) [*]
Pulmonary symptom onset	43.79 \pm 9.46 months (0-720 months) [*]
SpO2	94.99 \pm 0.32 (66-99) [*]
Bhalla score	8.67 \pm 0.49 (0-23) [*]
Kanga score	18.60 \pm 0.48 (10-40) [*]
Shwachman-Kulczycki score	66.14 \pm 1.35 (20-95) [*]
FVC (%)	79.73 \pm 2.05 (19-135) [*]
FEV1 (%)	71.97 \pm 2.39 (17-132) [*]
FEV1/FVC (%)	83.95 \pm 1.37 (37-137) [*]
FEF25-75%	59.81 \pm 3.11 (5-150) [*]
Nasal Polyps	19.08% (33) [#]
Diabetes mellitus	18.50% (32) [#]
Osteoporosis	16.18% (28) [#]
Pancreatic insufficiency	80.92% (140) [#]
Meconium ileus	14.86% (26) [#]
First isolated <i>P. aeruginosa</i>	104.09 \pm 15.36 months (2-180 months)
<i>P. aeruginosa</i> status ¹	55.10% (97) [#]
<i>P. aeruginosa mucoid</i> status ¹	42.00% (74) [#]
<i>B. cepacia</i> status ¹	13.60% (24) [#]
<i>A. xylosoxidans</i> status ¹	10.20% (18) [#]
<i>S. aureus</i> status ¹	78.40% (138) [#]

BMI = body mass index; % = percentage; SpO2 = Transcutaneous Hemoglobin Oxygen Saturation, FVC = forced vital capacity; FEV1 = forced expiratory volume in the first second; FEF25-75 = forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC. 2. Based on 3 consecutive positive respiratory cultures.

Percentage (patient number)^{*}

Continuous variables are expressed as the mean \pm SD (range)

Discussion

The modifier gene study allows for a better understanding of the variability of CF severity. Studies on lung disease modifier genes have been rarely performed because the focus in current studies is searching for new drugs that are responsive to specific mutations in the CFTR gene.

Our group has analyzed genes associated mainly with the immune system in combination with CF clinical severity [4-8], and we have tried to elucidate how disease variability of the occurs primarily in regard to the pulmonary phenotype.

Thus, the ADRA2A gene and its polymorphisms (rs553668 and rs10885122) were selected. These polymorphisms have been associated with diabetes mellitus in previous studies because diabetes mellitus is a CF comorbidity that has increased together with increased life expectancy in CF patients. Moreover, these polymorphisms have importance in the immune system, particularly in response to bacteria that colonize the airways.

The pancreas is richly innervated by sympathetic neurons and nora-

ADRA2A is a Cystic Fibrosis Modifier Gene

drenaline and adrenaline acts to negatively regulate insulin secretion. Catecholamines stimulate α 2-ARs that are present in the pancreatic islet β cell postsynaptic membrane by blocking insulin release and causing hyperglycemia. It has been suggested that increased parasympathetic innervation or an enhanced response of these receptors or both contributes to the deficient secretory response to glucose in type 2 diabetes mellitus (DMII) patients [11].

α 2-AR overexpression contributed to DMII development [17]. The rs553668 polymorphism was associated with DMII risk. The A allele was associated with a higher fasting blood glucose value compared with the homozygous G allele, and the same was observed for the rs553668A/rs10885122T haplotype [25], which is associated with DMII, an important CF comorbidity.

Table 2- Genotypic characteristic of ADRA2 gene polymorphisms and CFTR gene mutations among Cystic Fibrosis patients

Gene	Chromosome position	Location	Variation	Genotype			MAF	c ²	p*	
				G/G	G/T	T/T				
ADRA2, rs10885122	10q25.2	intergenic region	G>T	17 (10.24%) A/A	115 (69.28%) A/G	34 (20.48%) G/G	0.45	26.59	<0.001 ¹	
ADRA2, rs553668	10q25.2	3' untranslated region	A>G	20 (12.99%)	116 (75.32%)	18 (11.69%)	0.49	39.55	<0.001 ¹	
CFTR mutation genotype				N	Frequency					
F508del/F508del				47	26.70%					
F508del/G542X				12	6.82%					
F508del/R1162X				5	2.84%					
F508del/N1303K				4	2.27%					
F508del/R553X				2	1.14%					
F508del/S4X				1	0.57%					
F508del/1717-1G>A				1	0.57%					
F508del/2184insA				1	0.57%					
G542X/R1162X				1	0.57%					
G542X/I618T				1	0.57%					
G542X/2183A>G				1	0.57%					
R1162X/R1162X				1	0.57%					
F508del/duplication of exons 6b to 16				1	0.57%					
711+1G→T/622-2A>G				1	0.57%					
3120+1G àA /3120+1G àA				1	0.57%					
3120+1G àA/R1066C				1	0.57%					
G542X/P205S				1	0.57%					
G542X/R334W				1	0.57%					
D110H/V232H				1	0.57%					
R334W/R334W				1	0.57%					
R334W/R1066C				1	0.57%					
F508del/-				39	22.16%					
G542X/-				5	2.84%					
R1162X/-				1	0.57%					
3120+1G àA /-				1	0.57%					
I507V/-				1	0.57%					
TG11-5T1/-				1	0.57%					
-/-				42	23.86%					

ADRA2 = Adrenergic receptor alpha 2; CFTR = Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; C = Cytosine; T = Thymine; A = Adenine; G = Guanine; < = less than; MAF = minor allele frequency; % = percentage; *p = value for Hardy-Weinberg Equilibrium; N = patient number; (-) CFTR mutation no identified. 1= ADRA2, rs10885122 and rs553668 polymorphisms are not in Hardy-Weinberg Equilibrium in our sample.

Table 3- rs553668 and rs10885122 polymorphism haplotype groups in the ADRA2 gene

Haplotype ¹	Frequency ²	Genotype combination ³	Haplotype group ⁴
0	1 (0.69%)	GG/GG	0
1	16 (11.11%)	GG/GT	0
2	1 (0.69%)	GG/TT	0
3	11 (7.64%)	GA/GG	0
4	79 (54.86%)	GA/GT	1*
5	17 (11.81%)	GA/TT	0
6	1 (0.69%)	AA/GG	0
7	11 (7.64%)	AA/GT	0
8	7 (4.86%)	AA/TT	0

1. ADRB2 polymorphism haplotype groups. The number code was used to demonstrate the different groups of ADRB2 polymorphism combinations. 2. Haplotype frequency-patient number (percentage). 3. Genotype groups of rs553668 and rs10885122 ADRB2 polymorphisms, respectively. 4. Haplotype group statistical analysis. # Heterozygote rs553668 and rs10885122 ADRB2 polymorphisms were prevalent and used for all of the associations.

α 2-AR expression is decreased in the airway by repeated exposure to allergens and other antigens that are associated with the asthma-

associated decline in lung function and increased bronchoconstriction [26]. In the respiratory system, α 2-AR inhibits smooth muscle tone by partially blocking glutamate release from the axonal endings. The glutamatergic drive to the vagal preganglionic neurons that innervate the tracheobronchial system promote the bronchoconstriction reflex [16], thus promoting respiratory system changes.

Flierl and colleagues (2007) verified that enzymes involved in catecholamine tyrosine hydroxylase (HT) and dopamine β -hydroxylase (DBH) synthesis in macrophages and polymorphonuclear cells (PMNs) enabled cells to synthesize and degrade adrenaline and noradrenaline. This synthesis occurred by stimulating the lipopolysaccharide (LPS) that is present in bacterial cell walls that is responsible for infectious processes. The catecholamines acted in a paracrine manner to stimulate macrophages and PMN α 2-ARs [12]. α 2-ARs exert important immunomodulatory effects on the antibacterial pulmonary inflammatory response. LPS-induced norepinephrine levels enhance the expression of receptors that promote proinflammatory cytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) production by macrophages and polymorphonuclear cells [15]. While α 2-AR stimulation in natural

killer T lymphocytes promotes anti-inflammatory cytokine (IFN- γ and IL-4) synthesis [13]. This exacerbated inflammatory response causes more injuries and a subsequent decline in lung function [15]. This phenomenon explains the common lung infections in CF.

In our study, we associated the rs553668 polymorphism and haplotype analysis with CF clinical variables. This analysis encompassed all of the patients including those with two CFTR mutations in classes I, II and III.

Table 4- Association of the rs10885122 and rs553668 polymorphisms in the ADRA2A gene with clinical variables in Cystic Fibrosis patients distributed by CFTR mutation and ADRA2A gene haplotype analysis

Variables	rs10885122				rs553668				Haplotype			
	Without taking CFTR mutation into account		Two CFTR mutations identified		Without taking CFTR mutation into account		Two CFTR mutations identified		Without taking CFTR mutation into account		Two CFTR mutations identified	
	p	pc	p	pc	p	pc	p	pc	P	pc	p	pc
Sex ¹	0.085	0.17	0.132	0.264	0.125	0.25	0.463	0.926	0.616	1	0.207	0.414
Race ¹	0.204	0.408	0.059	0.118	0.001	0.002	0.296	0.592	0.007	0.014	0.065	0.13
Age ¹	0.685	1	0.232	0.464	0.055	0.11	0.412	0.824	0.695	1	0.117	0.234
Onset of symptoms ¹	0.512	1	0.477	0.954	0.068	0.136	0.122	0.244	0.663	1	0.685	1
Onset of pulmonary disease ¹	0.801	1	0.953	1	0.102	0.204	0.347	0.694	0.773	1	0.337	0.674
Onset of digestive disease ¹	0.259	0.518	0.488	0.976	0.117	0.234	0.04	0.08	0.194	0.388	0.398	0.796
Diagnosis ¹	0.804	1	0.205	0.41	0.011	0.022	0.196	0.392	0.872	1	0.411	0.822
BMI ¹	0.402	0.804	0.323	0.646	0.208	0.416	0.007	0.014	0.835	1	0.028	0.056
Bhalla score ²	0.552	1	0.262	0.524	0.945	1	0.571	1	0.282	0.564	0.042	0.084
Kanga score ²	0.285	0.57	0.253	0.506	0.837	1	0.955	1	0.293	0.586	0.414	0.828
Shwachman-Kulczycki score ²	0.194	0.388	0.308	0.616	0.27	0.54	0.004	0.008	0.043	0.086	0.025	0.05
Nasal polyposis ¹	0.655	1	0.238	0.476	0.124	0.248	0.177	0.354	1	1	1	1
Diabetes mellitus ¹	0.821	1	0.82	1	0.633	1	0.736	1	0.538	1	1	1
Osteoporosis ¹	0.662	1	0.941	1	0.92	1	0.966	1	0.29	0.58	1	1
Meconium ileus ¹	0.524	1	0.19	0.38	0.015	0.03	0.006	0.0012	0.815	1	1	1
Insufficiency pancreatic ¹	0.905	1	0.352	0.364	0.728	0.182	0.637	1	0.204	0.408	1	1
SpO ₂ ²	0.694	1	0.253	0.506	0.204	0.408	0.139	0.278	0.516	1	0.335	0.67
FVC(%) ²	0.081	0.162	0.053	0.106	0.569	1	0.595	1	0.034	0.068	0.019	0.038
FEV ₁ (%) ²	0.453	0.906	0.18	0.36	0.515	1	0.515	1	0.2	0.4	0.063	0.126
FEV ₁ /FVC ²	0.904	1	0.944	1	0.32	0.64	0.779	1	0.467	0.934	0.417	0.834
FEF ₂₅₋₇₅ % ²	0.777	1	0.502	1	0.52	1	0.522	1	0.622	1	0.159	0.318
1st <i>P. aeruginosa</i> ¹	0.323	0.646	0.44	0.88	0.03	0.06	0.23	0.46	0.708	1	0.249	0.498
<i>P. aeruginosa mucoid</i> ¹	0.212	0.424	0.114	0.228	0.118	0.236	0.444	0.888	0.095	0.19	0.311	0.622
<i>P. aeruginosa no mucoid</i> ¹	0.043	0.086	0.615	1	0.622	1	0.886	1	0.028	0.056	0.437	0.874
<i>A. xylosoxidans</i> ¹	0.324	0.648	0.808	1	0.812	1	0.64	1	0.036	0.072	0.531	1
<i>S. aureus</i> ¹	0.274	0.548	0.76	1	0.761	1	0.268	0.536	0.297	0.594	0.167	0.334
<i>B. cepacia</i> ¹	0.919	1	0.804	1	0.821	1	0.319	0.386	0.648	1	0.365	0.73

ADRA2 = Adrenergic receptor alpha 2; CFTR = Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; BMI = body mass index; SpO₂ = Transcutaneous Hemoglobin Oxygen Saturation; FVC - forced vital capacity; FEV₁ - forced expiratory volume in the first second; FEF₂₅₋₇₅ - forced expiratory flow between 25 and 75% of FVC. p = p-value of statistical tests. pc = p-value of statistical tests corrected by Bonferroni's test. P-values that are significantly different are in bold. 1. Categorical variables-the Fisher test was used. 2. Numerical variables-Student's t-test was used.

Table 5- Association of Cystic Fibrosis severity with the rs553668 polymorphism and ADRB2 gene haplotype in reference to the categorical variable with corrected positive p-values

rs553668	Without taking CFTR mutation into account				Patients with two class I, II or III CFTR mutations			
	Race		OR	95% CI	Meconium ileus		OR	95% CI
Caucasian	No Caucasian	Presence			Absence	T, AT		
G/G	17	1	1.64	0.256-37.48	7	11	4.36	1.42-12.94
G/A	110	6	4.09	1.24-13.86	15	100	0.48	0.19-1.22
A/A	14	6	0.13	0.04-0.47	2	18	0.56	0.08-2.31
rs553668	Meconium ileus		OR	95% CI	BMI		OR	95% CI
	Presence	Absence			T, AT	NW, OV, O		
G/G	6	6	6.85	1.67-29.19	6	6	6.718	1.64-28.63
G/A	7	41	0.43	0.12-1.57	5	43	0.18	0.05-0.66
A/A	0	9	-	-	2	6	1.475	0.184-8.09
Haplotype	Race		OR	95% CI	Haplotype analysis			
	Caucasian	No Caucasian						
GA/GT	55	10	0.15	0.02-0.621				
Others	77	2	1	-				

ADRA2 = Adrenergic receptor alpha 2; CFTR = Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; % - percentage; CI = confidential interval; G = guanine; A = adenine; T = thymine; BMI = body mass index; OR = odds ratio; T = thinness; AT = accentuated thinness; NW = normal weight; OV = overweight; O = obese. Odds ratio to values with statistical significance is in bold.

In clinical practice, the association of the rs553668 polymorphism and both polymorphism haplotypes with the patient's race is not important, but may be a caveat to the presence of an admixture population in our study. Race is associated with polymorphism distribution, but cannot be a risk factor for CF severity.

No additional diabetes risk factors were observed with the polymorphisms; however, the polymorphism rs553668 GG genotype presented risk factors for diagnosis, minor BMI and higher meconium ileus frequency. The GA genotype demonstrated higher values for the Shwachman-Kulczycki score, and the lowest BMI demonstrated protection.

The time of diagnosis is an important clinical variable because the diagnosis is made earlier with more severe disease. Patients with the GG genotype were included in the group with thinness and accentuated thinness together with meconium ileus presence at birth, which is a severity factor. For this polymorphism, the heterozygote patients were protected against thinness and accentuated thinness and had a better Shwachman-Kulczycki score, which is considered to be a good measure of CF severity [18].

The haplotype that was heterozygous for both polymorphisms was associated with higher Shwachman-Kulczycki scores and FVC(%) values, which may be associated with increased polymorphism homozygosity in the study population, which reduces gravity and is evidenced by the higher Shwachman-Kulczycki score and FVC value.

Conclusion

The CF clinical response was associated with *ADRA2A* polymorphisms, especially for the *CFTR* rs553668 polymorphism and haplotype analysis. The *ADRA2A* polymorphism analysis must still be performed in larger populations with complete *CFTR* mutation characterization, and functional analysis of the *ADRA2A* protein should also be considered.

With increased life expectancy, modifier genes that are mainly active in CF comorbidities are highlighted; thus, further studies should be conducted.

Modifier genes also have an important secondary role as mediators of therapeutic responses and may be important for their correct function.

List of Abbreviations

%: percentage

(NH₄)₂SO₄: Ammonium Sulfate

°C: Celsius

ACE: Angiotensin-converting Enzyme

ADRA2A: 2-Adrenergic Receptor Alpha

ADRB2: Beta-2-adrenergic Receptor

ARMS: PCR - amplification refractory mutation system

BMI: Body Mass Index

cAMP: cyclic adenosine 5'-monophosphate

CD14: Monocyte Differentiation Antigen 14

CF: Cystic Fibrosis

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CI: Confidential Interval

DAG: diacylglycerol

DBH: dopamine β-hydroxylase

DMII: diabetes mellitus type II

DNA: Deoxyribonucleic Acid

dNTP: Deoxyribonucleotide Triphosphates

FEF25-75: Forced Expiratory Flow Between 25 and 75% of FVC

FEV₁: Forced Expiratory Volume in the First Second

FVC: Forced Vital Capacity

GSTM1: Glutathione S-transferase Mu 1

GSTT1: Glutathione S-transferase Tetha 1

HT: catecholamines tyrosinehydroxylase

IP3: inositol 1,4,5-triphosphate

LPS: lipopolysaccharide

MBL-2: Mannose-binding Lectin (protein C) 2

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

mM: Milimolar

N: Number of Patients

PAM: *Pseudomonas aeruginosa*

PANM: *Pseudomonas aeruginosa* no mucoid

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMNs: Polymorphonuclear cells

pmoL: Picomol

RFLP: restriction fragment length polymorphism

SpO₂: Transcutaneous Hemoglobin Oxygen Saturation

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TCFL2: Transcription Factor 7-like 2

TGFβ-1: Transforming Growth Factor beta 1

WHO: World Health Organization

α2-AR: Alpha-2A adrenergic receptor

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Authors Contributions

LMR/FALM: Made substantial contributions to the conception and design of the manuscript as well as data acquisition, data analysis and data interpretation; were involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

JDR: performed the molecular genetic studies and was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.

CSB: made substantial contributions to the conception and design of the manuscript as well as data acquisition, data analysis and data interpretation; was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; gave final approval of the version to be published.

Acknowledgments

We acknowledge Luciana Cardoso Bonadia, Tais Daiene Russo Hortencio, Kátia Cristina Alberto Aguiar, Aline Gonçalves, Carlos Emilio Levy, Maria de Fátima Servidoni and Simoni Avansini for assistance in data collection and organization of ideas. We also acknowledge Maria Angela Ribeiro and LAFIP staff-(Laboratório de Fisiologia Pulmonar) for spirometry analysis. We also acknowledge Fapesp for search assistance. Finally, we acknowledge www.laboratoriomultiusuuario.com.br for making the genetic analysis possible.

References

- [1] Drumm M.L., Ziady A.G., Davis P.B. (2012) *Annu. Rev. Pathol.*, 7, 267-282.
- [2] Knowles M.R., Drumm M. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2(12), a009548.
- [3] Dorfman R. (2012) *Curr. Pharm. Des.*, 18(5), 674-682.
- [4] Faria E.J., Faria I.C., Ribeiro J.D., Ribeiro A.F., Hessel G., Bertuzzo C.S. (2009) *J. Bras. Pneumol.*, 35(4), 334-42.
- [5] Lima C.S., Ortega M.M., Marson F.A.L., Zulli R., Ribeiro A.F., Bertuzzo C.S. (2012) *J. Bras. Pneumol.*, 38(1), 50-6.
- [6] Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Hortencio T.D., Ribeiro J.D., Bona-dia L.C., Ribeiro A.F. (2012) *BMC Pulm. Med.*, 12, 41.
- [7] Marson F.A.L., Bertuzzo C.S., Ribeiro A.F., Ribeiro J.D. (2012) *BMC Pulm Med.*, 12(1), 50.
- [8] Furgeri D.T., Marson F.A.L., Ribeiro A.F., Bertuzzo C.S. (2012) *BMC Res. Notes.*, 5, 561.
- [9] Kobilka B.K., Matsui H., Kobilka T.S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Regan J.W. (1987) *Science*, 238 (4827), 650-6.
- [10] MacDonald E., Kobilka B.K., Scheinin M. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, 18(6), 211-9.
- [11] Devedjian J.C., Pujol A., Cayla C., George M., Casellas A., Paris H., Bosch F. (2000) *Diabetologia*, 43, 899-906.
- [12] Flierl M.A., Rittirsch D., Nadeau B.A., Chen A.J., Sarma J.V., Zetoune F.S., McGuire S.R., List R.P., Day D.E., Hoessel L.M., Gao H., Van Rooijen N., Huber-Lang M.S., Neubig R.R., Ward P.A. (2007) *Nature*, 449, 721-726.
- [13] Bao J.Y., Huang Y., Wang F., Peng Y.P., Qiu Y.H. (2007) *Neuroimmunomodulation*, 14, 344-353.
- [14] Kurnik D., Muszkat M., Li C., Sofowora G.G., Solys J., Xie H.G., Harris P.A., Jiang L., McMunn C., Ihrie P., Dawson E.P., Williams S.M., Wood A.J.J., Stein C.M. (2006) *Clin. Pharmacol. Ther.*, 79, 173-185.
- [15] Ying L., Xi Z., Wan-Zhen Y., Yan-lin Y., La-Ta A., Li C. (2011) *Chinese Medical Journal*, 124(7), 1069-1074.
- [16] Wilson C.G., Akhter S., Mayer C.A., Prabha K.C., Balan K.V., Emsberger P., Haxhiu M.A. (2007) *J. Appl. Physiol.*, 103, 2095-2104.
- [17] Rosengren A.H., Jokubka R., Tojjar D., Granhall C., Hamson O., Li O. (2010) *Science*, 327, 217-220.
- [18] Santos C.I.S., Ribeiro J.D., Ribeiro A.F., Hessel G. (2004) *J. Bras. Pneumol.*, 30(3), 286-298.
- [19] World Health Organization (2006) *WHOAntro, Version 3.0.1.*, Geneva.
- [20] World Health Organization (2007) *WHOAntroPLUS, Version 1.0.2.*, Geneva.
- [21] Duta-Cornescu G., Simon-Gruita A., Constantin N., Stanciu F., Dobre M., Banica D., Tuduce R., Cristea P., Stoian V. (2009) *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4845-4850.
- [22] Dean A.G., Dean J.A., Coulombier D., Brendel K.A., Smith D.C., Burton A.H., Dicker R.C., Sullivan K., Fagan R.F., Amer T.G. (1994) *EPI Info, Version 6.0*, Atlanta, Georgia: Center of Disease Control and Prevention.
- [23] Faul F., Erdfelde E., Lang A.G., Buchner A. (2007) *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.
- [24] Drăghici S. (2003) *Data Analysis tools for DNA Microarrays*. Chapman & Hall/CRC, New York.
- [25] Talmud P.J., Cooper J.A., Gaunt T., Holmes M.V., Shah S., Palmen J., Drenos F., Shah T., Kumari M., Kivimaki M., Whit-taker J., Lawlor D.A., Day I.N., Hingorani A.D., Casas J.P., Humphries S.E. (2011) *Diabetologia*, 52, 1710-1719.
- [26] Vaieilancourt V.T., Bordeleau M., Laviolette M., Laprise C. (2012) *BMC Research Notes*, 5, 630-636.

5. DISCUSSÃO

Estudos com genes modificadores permitem uma melhor compreensão da variabilidade na gravidade da FC. Atualmente, o estudo com genes modificadores, principalmente de doenças pulmonares tem sido raramente realizado desde que o foco nos estudos atuais é a busca por novas drogas.

No entanto, o nosso grupo tem analisado genes associados ao sistema imune em combinação com a gravidade clínica da FC (Faria *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012; Marson *et al.*, 2012a, Marson *et al.*, 2012b; Furgeri *et al.*, 2012) e tenta elucidar como a variabilidade da doença ocorre principalmente em aspecto pulmonar.

5.1. *TCF7L2*

Florez e colaboradores (2006) pesquisaram se as duas variantes (rs12255372 e rs7903146) predisõem a progressão para diabetes em 3.548 pessoas com tolerância diminuída à glicose, incluídas no Programa de Prevenção de Diabetes, no qual a intervenção no estilo de vida ou o tratamento com metformina foi comparada ao placebo.

Os dados encontrados mostraram que os alelos de risco em rs7903146 e rs12255372 aumentam significativamente o risco de diabetes.

Em 2009, Blackman e colaboradores já testaram se a história familiar de diabetes tipo 2 influencia o risco de diabetes em pacientes com FC em 539 famílias num estudo de famílias com irmãos gêmeos e não-gêmeos fibrocísticos. Foram avaliados 998 pacientes do estudo com famílias e 802 pacientes fibrocísticos não familiares em um estudo caso – controle. A história familiar de diabetes tipo 2 mostra aumentar o risco de DM2 em pacientes com FC. A variante no gene *TCF7L2* associada com diabetes tipo 2 (alelo T em

rs7903146) foi associada com diabetes em pacientes com FC no estudo familiar e no estudo caso-controle.

No estudo familiar a variação no gene *TCF7L2* aumentou o risco de diabetes em 3 vezes e diminuiu a idade média do diagnóstico da diabetes para 7 anos. Em pacientes com FC não tratados com glucocorticóides sistêmico, o efeito de *TCF7L2* foi ainda maior.

Uma variante genética que confere risco para diabetes tipo 2 na população geral é um modificador de risco para a diabetes na FC.

Usando um modelo de regressão logística incorporando ascendência individual, sexo, idade, índice de massa corporal e educação em 286 pacientes mexicanos com Diabetes Mellitus tipo 2 e 275 controles, Parra e colaboradores (2007) analisaram os microssatélites DG10S478 no íntron 3 e rs12255372 no íntron 4 do gene *TCF7L2* e observaram uma associação significativa entre rs12255372 e DG10S478 e Diabetes Mellitus tipo 2.

Mayans e colaboradores (2007) genotiparam 4 SNPs no gene *TCF7L2* em 872 pacientes suecos com diabetes tipo 2 e 857 controles pareados quanto a idade, sexo e localização geográfica e encontraram novamente a associação previamente identificada entre rs12255372 e a doença.

Miyake e colaboradores (2009) analisaram 5 SNPs no gene *TCF7L2* em 2.214 indivíduos japoneses com diabetes tipo 2 e 1.873 controles e confirmaram associação significativa com rs12255372, confirmando que *TCF7L2* é um gene de suscetibilidade importante para diabetes tipo 2 na população japonesa. A associação permaneceu significativa após ajuste para idade, sexo e IMC.

Para encontrar variantes genéticas que influenciam a suscetibilidade a DM2, Sladek e colaboradores (2007) testaram 392.935 SNPs em um grupo francês caso-controle. As variantes com diferença mais significativa nas frequências genotípicas entre os casos de diabetes tipo 2 e controles foram testados em um segundo grupo. Neste, identificaram quatro loci contendo variantes que conferem o risco de diabetes tipo 2, além de confirmar a conhecida associação com o gene *TCF7L2*.

Zeggini e colaboradores (2007) realizaram um estudo de associação de genoma da diabetes tipo 2, utilizando dados de 1.924 casos de diabéticos e 2.938 controles gerados pelo The Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) e análise de 3.757 casos e 5.346 controles adicionais, de outros consórcios internacionais. Os sinais mais fortes de associação de genoma pleno, foram observados para SNPs no gene *TCF7L2*.

A consistência destes resultados sugeriu que *TCF7L2* é o único maior efeito de um SNP comum no tipo de risco de diabetes 2 em populações européias.

O genótipo G/T de rs12255372 está associado ao aumento do risco de DM2 e o genótipo T/T está associado ao aumento do risco de câncer de mama, DM2 e a forma agressiva do câncer de próstata.

A aplicação deste tipo de análise constitui uma boa alternativa para a confirmação de pacientes fibrocísticos com risco aumentado de apresentarem a DRFC.

Esperamos que futuros estudos permitam estabelecer todas as possíveis associações que reflitam o perfil próprio da nossa população.

5.2. *ADRA2A*

Os polimorfismos do gene *ADRA2A* foram associados com a Diabetes Mellitus em estudos anteriores, sendo a Diabetes Mellitus uma comorbidade da FC, e isto tem aumentado com o aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC.

O pâncreas endócrino é ricamente innervado por nervos simpáticos e tem sido demonstrado que a noradrelina e adrenalina atuam na regulação negativa da secreção de insulina. Catecolaminas estimulam $\alpha 2$ -ARs presente na membrana pós-sináptica das células β das ilhotas pancreáticas, bloqueando a liberação de insulina e provocando hiperglicemia. Foi sugerido um aumento na inervação parassimpática ou uma melhora na resposta desses receptores, ou ambos, para uma resposta secretora à glicose deficiente em pacientes com DM2 (Devedjian *et al.*, 2000).

Há uma superexpressão de $\alpha 2$ -ARs que contribuiu para o desenvolvimento de DM2 (Rosengren *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, encontramos associação do polimorfismo rs553668 e análise dos haplótipos com as variáveis clínicas da FC. Esta análise abrangeu todos os pacientes, inclusive aqueles com duas mutações classes I, II ou III no gene *CFTR*.

O polimorfismo rs553668 foi associado com o risco DM2 e o alelo A foi associado com maior valor de glicemia de jejum em comparação com homozigotos para o alelo G (Talmud *et al.*, 2011).

A expressão de $\alpha 2$ -AR é diminuída nas vias aéreas devido à exposição repetida à alérgenos e outros antígenos associados ao declínio da função pulmonar e ao aumento da broncoconstrição em pacientes com asma (Vaielancourt *et al.*, 2012).

No sistema respiratório, a α 2-AR inibe a tonicidade do músculo liso, bloqueando parcialmente a liberação de glutamato nas terminações axonais. Essa liberação de glutamato nos neurônios pré-ganglionares que inervam o sistema traqueobronquial promove o reflexo de broncoconstrição, promovendo alterações no sistema respiratório (Wilson *et al*, 2007).

Flierl e colaboradores (2007) verificaram que a presença de enzimas envolvidas na síntese da catecolamina tirosine hidroxilase (HT) e dopamina β -hidroxilase (DBH), em macrófagos e células polimorfonucleares (PMNs), torna as células capazes de sintetizarem e degradarem adrenalina e noradrenalina. A síntese ocorre por estimulação do lipopolissacarídeo (LPS) presente nas paredes celulares das bactérias responsáveis pelos processos infecciosos. As catecolaminas produzidas exercem ação parácrina, estimulando as α 2-ARs de macrófagos e PMNs.

As α 2-ARs exercem efeito imunomodulador importante na resposta inflamatória dos pulmões contra as infecções bacterianas. Níveis aumentados de noradrenalina por estimulação por LPS aumentam a expressão de tais receptores que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) por macrófagos e células polimorfonucleares (Ying *et al.*, 2011). A estimulação do α 2-ARs em linfócitos NKT (Natural Killer T) leva à síntese de citocinas anti-inflamatórias (IFN- γ e IL-4) Bao *et al.*, 2007). A resposta inflamatória exacerbada provoca mais lesões com posterior declínio na função pulmonar (Ying *et al.*, 2011).

Rosengren e colaboradores (2010) descobriram que os indivíduos com o alelo GG no polimorfismo rs553668 exibiram super expressão de alfa-2A adrenérgico, reduzindo a secreção de insulina e aumentando o risco de diabetes tipo 2.

As células das ilhotas pancreáticas dos portadores do alelo de risco secretam menos insulina em resposta à glicose. Esse efeito é neutralizado por drogas alfa-2A antagonistas dos receptores adrenérgicos.

O alelo de risco do polimorfismo rs553668 foi associado com redução da insulina em jejum, bem como uma secreção diminuída e lenta em resposta à glicose oral. Em uma análise de caso-controle de 3.740 não-diabéticos e 2.830 diabéticos, rs553668 foi associado com aumento do risco de diabetes tipo 2.

Ao focalizar os indivíduos com baixo IMC ou com baixos níveis de peptídeo C, o aumento do risco de diabetes tipo 2 também foi evidente também entre os indivíduos heterozigotos.

Em nosso estudo, encontramos a associação do polimorfismo rs553668 e haplótipos com as variáveis clínicas da FC. As análises foram feitas levando em conta todos os pacientes ou o grupo de pacientes com duas mutações em *CFTR* identificadas (classe I, II e III).

A associação do polimorfismo rs553668 e dos haplótipos para ambos os polimorfismos, com a raça do paciente é complexa, levando-se em conta a miscigenação populacional no nosso estudo. A raça é um fator associado à distribuição de polimorfismo, mas não pode ser um fator de risco para gravidade da FC.

Para a diabetes, nenhum fator de risco adicional para a presença dos polimorfismos foi observado, no entanto, o genótipo GG do polimorfismo rs553668 apresenta associação com a idade no momento do diagnóstico, menor IMC e maior frequência para íleo meconial. O genótipo GA apresenta maiores valores para Escore de Shwachman-Kulczycki e proteção contra um IMC menor.

O tempo do diagnóstico é uma importante variável clínica, sendo que nos casos com evolução mais grave da doença, o diagnóstico é precoce. Ao mesmo tempo, os doentes com genótipo GG foram incluídos no grupo com magreza e magreza acentuada, junto com a presença de íleo meconial no nascimento, sendo um fator de gravidade.

Para o mesmo polimorfismo, os pacientes heterozigotos apresentam proteção contra magreza e magreza acentuada, e valores melhores para o escore de Shwachman-Kulczycki, que é considerado um bom escore para avaliar a gravidade da FC (Santos *et al.*, 2004).

O haplótipo heterozigoto para ambos os polimorfismos foi associado com maiores valores de Escore de Shwachman-Kulczycki e CVF(%), o que pode levar a uma menor gravidade.

6. CONCLUSÃO

6.1. *TCF7L2*

O alelo T, do polimorfismo rs12255372, foi o mais frequente.

O polimorfismo rs12255372, no gene *TCF7L2*, não mostra qualquer associação com a diabetes em nossa amostra.

Tendo em conta estes resultados, tornou-se interessante investigar o papel de outras variantes do gene *TCF7L2* no risco de Diabetes Mellitus em pacientes com fibrose cística.

6.2. *ADRA2A*

O alelo T, do polimorfismo rs10885122, e o alelo A, do polimorfismo rs553668, foram os mais frequentes em nossa amostra.

Foram encontrados 9 haplótipos diferentes na amostra de pacientes fibrocísticos utilizando os polimorfismos rs10885122 e rs553668 e o haplótipo GT/AG foi o que apresentou maior frequência.

A resposta clínica da FC foi associada aos polimorfismos do gene *ADRA2A*, especialmente o polimorfismo rs553668 e a análise de haplótipos, considerando as mutações no gene *CFTR*. Portanto, os polimorfismos rs553668 e rs10885122 no gene *ADRA2A* parecem ser moduladores da gravidade da FC em nossa amostra.

A análise dos polimorfismos do gene *ADRA2A* ainda deve ser realizada em populações maiores, com completa caracterização das mutações no gene *CFTR* e também deve ser considerada a análise funcional da proteína *ADRA2A*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

American Thoracic Society - ATS. Disponível em: <http://www.thoracic.org>. Acesso em: dezembro de 2012.

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

Alves, CAD; Aguiar, RA; Alves, ACS e Santana, MA. Diabetes melito: uma importante co-morbidade da fibrose cística. *J. bras. pneumol.* [online]. 2007, vol.33, n.2, pp. 213-221. ISSN 1806-3713.

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

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

Anderson MP, Gregory R J, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that *CFTR* is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-205.

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

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

Austin A, Kalhan SC, Orenstein D, Nixon P, Arslanian S. Roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction in the pathogenesis of glucose intolerance in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:80-5.

Azzopardi K, Lowes L. Management of cystic fibrosis-related diabetes in adolescence. *Br J Nurs.* 2003;12(6):359-63.

Bao JY, Huang Y, Wang F, Peng YP, Qiu YH. Expression of α -AR subtypes in T lymphocytes and role of the α -AR in mediating modulation of T cell function. *Neuroimmunomodulation*, 2007; 14:344-353.

Bear CE, Li C, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*). *Cell* 1992; 68: 809.

Bedrossian CWM, Greenberg SD, Singer DB. The lung in cystic fibrosis: a quantitative study including prevalence of pathological finding among different age groups. *Hum Patol*, 7: 196, 1976.

Bernardino LF, Lima CE, Zats M. Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene in patients with obstructive azoospermia. *Genet Molec Biol* 2003; 26 (1): 1-3.

Blackman SM, Hsu S, Ritter SE, Naughton KM, Wright FA, Drumm ML, Knowles MR, Cutting GR: A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis. *Diabetologia* 2009,52(9):1858–1865.

Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of *CFTR* mutations – correlation with the incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19: 575-606.

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

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

Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and *CFTR*-related diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 2003; 9(6):498-503.

Boyle MP. Strategies for Identifying Modifier Genes in Cystic Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.*2007;4(1): 52–57.

Brennan AL, Geddes DM, Gyi KM, Baker EH. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J cystic Fibrosis.* 2004;3(4):209-222.

Brennan AL, Gyi KM, Wood DM, Hodson ME, Geddes DM, Baker EH. Relationship between glycosylated haemoglobin and mean plasma glucose concentration in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2006; 2:27-31.

Brennan AL, Gyi KM, Wood DM, Johnson J, Holliman R, Baines DL, et al. Airway glucose concentrations and effect on growth of respiratory pathogens in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2007; 6:101-109.

Bylund, DB. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? *Br J Pharmacol* 2005; 144 (2): 159-60.

Camargos PA, Guimarães MD, Reis FJ. Prognostics aspects of cystic fibrosis in Brazil. *Ann Trop Paediatr* 2000; 20(4): 287-291.

Campos e Szterling (1970) apud Campos JVM, Kotze LMS, Damaceno N, Carvalho CRR. Fibrose Cística – Mucoviscidose. São Paulo. IBEPEGE. *Arquivos de Gastroenterologia*; 1996,48p.

Campos JVM, Kotze LMS, Damaceno N, Carvalho CRR, Fibrose Cística – Mucoviscidose. São Paulo. IBEPEGE. *Arquivos de Gastroenterologia* 1996; 48p.

Cerqueira, CC. O Papel do gene *ADRA2A* no transtorno de déficit de atenção/hiperatividade em adultos. 2009. 63 f. Tese (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Biociências - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Chakr VCBG, Silveira MR, Vendrusculo FM, Leites GT, Donadio MVF, Paim TF, Marostica PJC. Análise descritiva dos pacientes com fibrose cística em acompanhamento na unidade de pneumologia Pediátrica de um hospital universitário em Porto Alegre – RS. *Scientia Medica* 2006;16(3):103-108.

Chien AJ, Moon RT. WNTs and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes. *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:448-57.

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

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

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

Collins, F.S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256: 774- 779.

Correia C.A.A., Prevalência de Seis Mutações no Gene *CFTR* Em Portadores de Fibrose Cística da Região de Campinas 2005.101 f. Tese (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Costa M, Potvin S, Berthiaume Y, Gauthier L, Jeanneret A, Lavoie A, et al. Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab.* 2005;31(3 pt 1):221-232.

Costa M, Potvin S, Hammana I, Malet A, Berthiaume Y, Jeanneret A, et al. Increased glucose excursion in cystic fibrosis and its association with a worse clinical status. *Journal of Cystic Fibrosis* 2007;2:376-383.

Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Eberhardt MS, Flegal KM, Engelgau MM, Saydah SH, Williams DE, Geiss LS, Gregg EW:Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* 2006, 29:1263–1268.

CFF - Cystic Fibrosis Foundation. *Clinical Practice Guidelines for CF*. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 1997.

CFF - Cystic Fibrosis Foundation. Disponível em: <http://www.cff.org>. Acesso em 10 de abril de 2012.

CFGAC - Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. The Cystic fibrosis mutation database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/CFTR>. Acesso em 12 de novembro de 2012.

Davis PB, Drumm M, Konstan MW, Cystic Fibrosis. *Am J Crit Care Med* 1996; 154: 1229-1256.

Dawson KP, Frossard PM, The geografic distribution of cystic fibrosis mutations gives clues about population origins. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 496-99.

Dean AG, Dean JÁ, Coulombier D, Brendel KA, SmithDC, Burton AH, et al. *EPI Info, Version 6.0: a word processing database and statistics program for epidemiology on*

microcomputer. [computer program]. Atlanta, Georgia: Center of Disease Control and Prevention; 1994.

Della Manna T., Setian N, Rodrigues JC. Uma Comorbidade Cada Vez Mais Frequente. Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52/2.

Della Manna T. Avaliação do comprometimento endócrino do pâncreas em crianças e adolescentes portadores de fibrose cística. [tese doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da universidade de são Paulo; 2006. disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponíveis/5/5141/tde-11042007-112815>.

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

DeSchepper J, Hachimi-idrissi S, Smitz J, Dab I, Loeb H. First-phase insulin release in adult cystic fibrosis patients: correlation with clinical and biological parameters. Horm res. 1992;38:260-3.

Devedjian JC, Pujol A, Cayla C, George M, Casellas A, Paris H, Bosch F. Transgenic mice overexpression $\alpha 2A$ -adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. Diabetologia, 2000; 43:899-906.

Devlin TM. Manual de bioquímica com correlação clínica, 4ªed., São Paulo, SP: Ed. Edgar Blucher LTDA, 1998.

Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953; 12: 549.

Dobson L, Sheldon CD, Hattersley AT. Understanding cystic-fibrosis-related diabetes: best thought of as insulin deficiency. *J R Soc Med.* 2004;97 Suppl 44:S26-S35.

Dorfman R: Modifier gene studies to identify new therapeutic targets in cystic fibrosis. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(5):674-682.

Dork T, Wulbrand U, Richter T. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 1991; 87: 441- 446.

Drăghici S. Data analysis tools for DNA microarrays. Chapman & Hall/CRC: New York, 2003.

Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. (2012) *Annu Rev Pathol.* 2012; 7:267-282.

Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2010;42:105–116.

Duta-Cornescu G, Simon-Gruita A, Constantin N, Stanciu F, Dobre M, Banica D, Tuduce R, Cristea P, Stoian V. A comparative study of ARMS – PCR and RFLP – PCR as methods for rapid SNP identification. *Romanian Biotechnological Letters*, 2009; 14(6):4845-4850.

Duval A, Rolland S, Tubacher E, Bui H, Thomas G, Hamelin R. The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3872-9.

Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteney. *Clin Genet* 1985; 28: 265-271.

Elder DA, Wooldridge JL, Dorlan LM, D'Alessio DA. Glucose Tolerance, Insulin Secretion, and Insulin Sensitivity in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis and Prior History of Diabetes. *The Journal of Pediatrics* 2007;151:653-658.

European Working Group. *Hum Genet* 1990; 85: 39-454.

Evans AK, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of the meconium ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *Eur Resp J* 2001; 18(5): 784-789.

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien. Med. Wschr.* 1936; 86:753-56.

Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. *J Michigan Med Soc* 1945; 44:587.

Faria EJ. Investigação da Associação Entre os Polimorfismos dos Genes: MBL2, TGF-B1 E CD14 com a gravidade do quadro pulmonar na fibrose cística. 2007. 140 f. Tese (Dissertação de Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Faria EJ, Faria IC, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS. Association of MBL2, TGF-beta1 and CD14 gene polymorphisms with lung disease severity in cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(4):334-42.

Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.G.; Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 2007; 39, 175-191.

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; 65: 284-87.

Fitz-Simmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 1993; 122: 1-9.

Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, Ward PA. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; 449:721-726.

Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D:Diabetes Prevention Program Research Group. *TCF7L2* polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006,355(3):241–250.

Franco, L.F, Crispin F, Pereira AC, JAPANESE-BRAZILIAN DIABETES STUDY GROUP Variants of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and incident glucose intolerance in Japanese-Brazilians. *Braz J Med Biol Res* [online]. 2011, vol.44, n.3, pp. 240-244. Epub Jan 26, 2011 ISSN 1414-431X.

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

Furgeri DT, Marson FA, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Association between the IVS4G>T mutation in the *TCF7L2* gene and susceptibility to diabetes in cystic fibrosis patients. *BMC Res Notes*. 2012; 5:561.

Garagorri JM, Rodríguez G, Ros L, Sánchez A. Early detection of impaired glucose tolerance in patients with cystic fibrosis and predisposition factors. *J Pediatr endocrinol Metab*. 2001;14:53-60.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23:545–549.

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

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006,38:320–323.

Hannon TS, Janosky J, Arslanian SA. Longitudinal study of physiological insulin resistance and metabolic changes of pu-berty. *Pediatr res*. 2006;60:759-63.

Hardin DS, Moran A. Diabetes mellitus in cystic fibrosis. *endo-crinol & Metab clin nAm*. 1999;28:787-801.

Hardin DS, Leblanc A, Marshall G, Seilheimer DK. Mechanism of insulin resistance in cystic fibrosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:1022-1228.

Hodson ME. Thematic Review series: Treatment of cystic fibrosis in the adult. *Respiration* 2000; 67: 95-607.

Houston RS, Tomlinson IPM. Modifier genes in humans: strategies for identification. *Eur J Hum Gen* 1998; 6: 80-88.

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

Iannucci A, Mukai K, Johnson D, Burke B. endocrine pancreas in cystic fibrosis: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 1984;15(3):278-84.

Jorde LB, Carey JCC, Bamshad MJ, White RL. *Genética médica, 2ºed.*, Rio de Janeiro, R J, Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Kaplan E, Swachman H, Permuter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclan DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1968; 279: 56-69.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.

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

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

Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(12):a009548.

Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Cong. NV, Frézal J, Brown VA, Brarker D, *et al.*, Polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis located on chromosome 7. *Nature* 1995; 318: 380-382.

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science*. 1987; 238(4827):650-6.

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

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

Kurnik D, Muszkat M, Li C, Sofowora GG, Solys J, Xie HG et al. Variations in the α 2A-adrenergic receptor gene and their function affects. *Clin Pharmacol Ther*, 2006; 79: 173-185.

Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control os white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 1993; 34 (7): 1057-91.

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

Lanng S, Thorsteinsson B, Lund-Andersen C, Nerup J, Schioz PO, Koch C. Diabetes mellitus in danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications. *Acta Pae-diatr. [scand]* 1994;83:72-7.

Lanng S, Hansen A, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Glucose tolerance in cystic fibrosis: a five year prospective study. *BMJ*. 1995;311:655-9.

Lanng S. Glucose intolerance in cystic fibrosis patients. *Pediatr Resp Rev*. 2001;2(3):253-9.

Lewis and Clark. Disponível em: <http://www.lclark.edu>. Acesso em 20 de agosto de 2011.

Lima CS, Ortega MM, Marson FA, Zulli R, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and glutathione S-transferase null genotypes in cystic fibrosis patients in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2012;38(1):50-6.

Littlejohn MD, Taylor DR, Miller AL, Kennedy MA. Determination of beta-2-adrenergic receptor (ADRB2) haplotypes by a multiplexed polymerase chain reaction assay. *Mutation in Brief* 2002; 562.

Lohr M, Goertchem P, Nizze H, et al. cystic fibrosis associated islet changes may provide a basis for diabetes. *virchows Arch*. 1989;414:179-85.

Lombardo F, De Luca F, Rosano M, Sferlazzas C, Lucanto C, Arrigo T, et al. Natural history of glucose tolerance, beta-cell function and peripheral insulin sensitivity in cystic fibrosis patients with fasting euglycemia. *Euro J Endocrinol*. 2003;149(1):53-9.

Lyczak BJ, Cannon CL, Pier GP. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol Rev* 2002; 15: 194 – 222.

Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the *TCF7L2* gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117:2155-2163.

MacDonald E, Kobilka BK, Scheinin M. Gene targeting-homing in on alpha 2-adrenoceptor-subtype function. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18(6):211-9.

Mackie AD, Thornton SJ, Edenborough FP:Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* 2003,20:425–36.

MacLusky I, Levison H. Cystic fibrosis. In: Chernick V, Boate TE. *Kendig's disorders of the respiratory tract in children.* Philadelphia Saunders 1990; 692-729.

Maestu J, Allik J, Merenakk L, Eensoo D, Parik J, Veidebaum T, Harro J. Associations between an alpha 2A adrenergic receptor gene polymorphism and adolescent personality. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147B (4): 418-23.

Marquezine, GF. Papel do polimorfismo rs7903146 do gene *TCF7L2* na população brasileira e sua aplicação na predição de risco de diabetes tipo 2. 2009. Tese (Doutorado em Cardiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *J Pediatr.* 2005;146(5):681-7.

Marson FA. Análise de genes modificadores relacionados à gravidade clínica da fibrose cística. 2011. 488 f. Tese (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Marson FA, Bertuzzo CS, Hortencio TD, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2012;12:41.

Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in ADRB2 gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2012; 12(1):50.

Massie RJ, Plsen M, Galzner J, Robertson CF, Francis I. Newborns screening for cystic fibrosis in Vistoria: 10 years experience (1989- 1998). *Med J Aust* 2000; 172 (12): 584-87.

Mayans S, Lackovic K, Lindgren P, Ruikka K, Agren A, Eliasson H, et al. *TCF7L2* polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern Sweden. *Eur J Hum Genet* 2007;15:342-6.

McKone EF, Emerson SS, Edwards K, Aitken M. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective study. *Lancet* 2003; 361, 1671–1

Merlo CA and Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab 287, Clin Med.* 2003,141:237–241

Milla CE, Warwick WJ, Moran A. Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:891–895.

Miyake K, Yang W, Hara K, Yasuda K, Horikawa Y, Osawa H, Furuta H, Ng MC, Hirota Y, Mori H. et al. Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *J Hum Genet.* 2009;54:236–241.

Moran A, Diem P, Klein DJ, Levitt MD, Robertson P. Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1991;118:715-23.

Moran A, Hardin D, Rodman D, Allen HF, Beall RJ, Borowitz D, et al. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1999;45:61-73.

Moran A. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis-related diabetes. *Curr Diab Rep.* 2002;2(2):111-5.

Moran A, Milla C. Abnormal glucose tolerance in cystic fibrosis: why should patients be screened? *The Journal of Pediatrics* 2003;142:97-99.

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

Mueller-Brandes C, Holl RW, Nastoll M, Ballmann M. New criteria for impaired fasting glucose and screening for diabetes in cystic fibrosis. *Eu Respir J*. 2005;25(4):715-17.

National diabetes data group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979;28:1039-57.

Oliveira MC, Reis FJ, Oliveira EA, Colosimo EA, Monteiro AP, Penna FJ. Prognostic factors in cystic fibrosis in a single center in Brazil: a survival analysis. *Pediatr Pulmonol*. 2002;34:3-10.

Parra EJ, Cameron E, Simmonds L, Valladares A, McKeigue, Shriver M, Wachter N, et al. Association of *TCF7L2* polymorphisms with type 2 diabetes in Mexico City. *Clin Genet* 2007; 71: 359–366.

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

Preumont V, Hermans MP, Buyschaert M. Diabetes in cystic fibrosis: A 2008 state of de art. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2008;2:77-80.

Prokunina-Olsson L, Welch C, Hansson O, Adhikari N, Scott LJ, Usher N, Tong M, Sprau A, Swift A, Bonnycastle LL, et al. Tissue-specific alternative splicing of *TCF7L2*. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3795–3804.

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

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

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

Rana M, Munns CF, Selvadurai H, Donaghue KC, Craig ME. Cystic fibrosis-related diabetes in children – gaps in the evidence? *Nature Reviews Endocrinology* 2012; 6,371-78.

Raskin S, Phillips III, JA, Krishnamani MRS. DNA analysis of cystic fibrosis in brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993, 46: 665-69.

Raskin S, Faucz F. Aspectos genéticos da fibrose cística. In: Carakushansky, G. Doenças genéticas. Guanabara Koogan. Pp. 227-241, 2001.

Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-689.

Reis FJC, Damaceno N. Fibrose cística. J Pediatr 1998; 74: S46-94.

Renström F, Shungin D, Johansson I. MAGIC Investigators, Florez JC, Hallmans G, Hu FB, Franks PW. Genetic predisposition to long-term nondiabetic deteriorations in glucose homeostasis: Ten-year follow-up of the glacier study. Diabetes. 2011 Jan;60(1):345-54.

Ribeiro JD, Ribeiro MAG De, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. J Pediatr 2002; 78 (s2):171-86.

Ribeiro KS, Lunardelli A, Oliveira, JR. Diabetes Relacionada à Fibrose Cística. Revista da Graduação, v. 1, p. 2, 2008.

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

Riordan JR. Identification of the cystic fibrosis gene. Science 1989; 245: 1066-73.

Robinson P. Pediatric origins of adult lung disease: Cystic Fibrosis. Thorax 2001; 56: 237-41.

Rommens MJ. Identification of the cystic fibrosis gene II. Science 1989; 245: 1059-65.

Rosenecker J, Eichler I, Kuhn L, Harms HK, Von der Hardt H. Genetic determination of diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 1995;127:441-3.

Rosengren AH, Jokubka R, Tojjar D, Granhall C, Hamson O, Li O. Overexpression of alpha 2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science*, 2010; 327: 217-220.

Rosenstein BJ. What is a cystic fibrosis diagnosis? *Clin Chest Med* 1998; 19(3):423-41.

Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132:589-9.

Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of *CFTR* mutation. *Annals of Hum Genet* 2003; 67: 471-85.

Rozov T. Mucoviscidose (Fibrose Cística do Pâncreas). In: Rozov T, editor. *Doenças Pulmonares em Pediatria*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 443-59.

Rozov T, Cunha MT, Nascimento O, Quittner AL, Jardim JR. Validação lingüística dos questionários de qualidade de vida em fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(2):151-6.

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

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

Santos CIS, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G. Critical analysis of scoring systems used in the assessment of Cystic Fibrosis severity: state of the art. (2004) *J. Bras. Pneumol.* 2004; 30(3):286-298.

Shishkina GT, Dygalo NN. Subtype-specific clinically important effects of alpha 2-adrenergic receptor. *Usp Fiziol Nauk* 2002; 33 (2): 30-40.

Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K. Transcription factor 7-like 2 regulates β -cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes.* 2008.57:645–653.

Simmonds NJ, MacNeil SJ, Cullinan P, Hodson ME: Cystic fibrosis and survival to 40 years: a case–control study. *Eur Respir J* 2010;36(6):1277–1283.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, et al. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007;445:881–885.

Slieker MG, Sanders EAM, Rijkers GT, Ruven HJT, Van Der Ent CK. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2005; 4: 7-13.

Sofeman R. Immunopathophysiologic mechanisms of cystic fibrosis lung disease. *I.M.A.J.* 2006;8:44-48.

Spence C. Cystic fibrosis-related diabetes: practice challenges. *Paediatr Nurs.* 2005;17(2):23-6

SPSS 17.0 for Windows (computer program). Statistical Package for Social Science (SPSS). Release Version 17.0.1. Chicago (IL): SPSS. Incorporation; 2011. Disponível em: <http://www.spss.com>.

Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1997;336(7):487-91.

Streit C, Bulamarque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. *CFTR* gene: molecular analysis in patients from south brazil. *Mol Genet And Met* 2003; 78:259-64.

Sturgess JM. Morphological characteristics of brochial mucosa in cystic fibrosis. In: Quiton PM, Martinez JR, Hopper U. Fluid and eletrolyte anormalities in exocrine glands in cystic fibrosis. San Francisco. San Francisco Press, 1982.

Talmud PJ, Cooper JA, Gaunt T, Holmes MV, Shah S, Palmén J, et al. Variants of *ADRA2A* are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk: meta-analysis of four prospective studies. *Diabetologia*, 2011; 52:1710-1719.

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

Thompson, MW, Mcinnes RR, Huntington, FW. In: *Genética Médica*, 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Tomashefski JR, Bruce M, Goldberg HI. Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis. *Am Rev Resp Dis* 1986; 133: 535.

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

Tsui LC, Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 32:115–142.

Tzetis M, Efthymiadou A, Doudounakis S, Kanavakis E: Qualitative and quantitative analysis of mRNA associated with four putative splicing mutations (621+3A→G, 2751+2T→A, 296+1G→C, 1717–9T→C-D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the *CFTR* gene. *Hum Genet* 2001,109(6):592–601.

Vaielancourt VT, Bordeleau M, Laviolette M, Laprise C. From expression pattern to genetic association in asthma – related phenotypes. *BMC Research Notes* 2012; 5:630-636.

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

Wainwrigth BJ, Scamber PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, et al. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7 cen-q22. *Nature* 1985; 318:284-285.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of *CFTR* chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-54.

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

Welters HJ, Kulkarni RN. Wnt Signaling: relevance to [beta]-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2008. 19(10):7.

WHO Antro [programa de computador]. Version 3.0.1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 2006.

WHOAntro PLUS [programa de computador]. Version 1.0.2. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 2007.

Wilcken B, Wiley V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Pediatr Resp Rev* 2003; 4:272-7.

Wilmott RW. Making the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1998; 132(4):563-5.

Wilson CG, Akhter S, Mayer CA, Prabha KC, Balan KV, Ernsberger P, Haxhiu MA. Allergic lung inflammation affects central noradrenergic control of cholinergic outflow to the airways in ferrets. *J Appl Physiol*, 2007; 103:2095-2104.

Yang-Feng TL, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Francke U. Chromosomal assignment of genes for an alpha-adrenergic receptor (ADRAR) and for another member of this receptor family coupled to guanine nucleotide regulatory proteins (RG21). (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 1987,46:722-723.

Ying L, Xi Z, Wan-Zhen Y, Yan-lin Y, La-Ta A, Li C. Yohimbine protects against endotoxin-induced acute lung injury by blockade of alpha 2A adrenergic receptor in rats. *Chinese Medical Journal*, 2011; 124(7):1069-1074.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007;40(5):638–645.

Zielenski J, Tsui LP. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. *Anu Rev Gen* 1995; 29: 777-807.

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

8. ANEXOS

8.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 09/08/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 528/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0422.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DA PRESENÇA DE POLIMORFISMOS NOS GENES MODIFICADORES ACE, GCLC, GST (M1, T1 E P1) E NOS-1 EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE APRESENTADA NO QUADRO CLÍNICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernando Augusto de Lima Marson

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/07/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/07/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Averiguar a prevalência de determinados polimorfismos nos genes modificadores *ACE*, *GCLC*, *GST* e *NOS-1*, em pacientes com fibrose cística com diagnóstico conhecido para as mutações no gene *CFTR*, e correlacionar os dados assim obtidos com as mutações nesse gene e em relação ao quadro clínico dos pacientes.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo transversal do tipo analítico. O trabalho será desenvolvido no Laboratório de Genética Médica da FCM/UNICAMP em associação com o Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas/UNICAMP. Pretende-se identificar polimorfismos dos genes modificadores em 70 pacientes do Ambulatório de Pediatria/HC que apresentam resultados alterados em pelo menos dois teste do suor (um teste específico para diagnóstico de fibrose cística caracterizado pela dosagem de cloreto no suor), com valores de cloro superiores a 60 mEq/L e que apresentam duas mutações no gene *CFTR*, conhecidas. Serão excluídos do estudo pacientes que não se enquadrem no critério acima e aqueles cujos pais não concordarem com a participação no estudo. A pesquisa se baseará na obtenção do DNA de leucócitos a partir da coleta de sangue periférico dos pacientes, amplificação gênica do mesmo por PCR, identificação das mutações do gene *CFTR* e dos polimorfismos nos genes modificadores, bem como na caracterização do comprimento pulmonar e digestivo. O estado geral dos pacientes será analisado através do Escore de Shwachman e serão feitas correlações entre os genótipos dos genes modificadores com o índice de massa corporal, sexo e raça. A metodologia proposta é adequada e está baseada na literatura recente na área do projeto. As condições a serem usadas no estudo bem como os critérios de inclusão/exclusão são estabelecidos adequadamente.



IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A proposta de trabalho esta baseada na literatura recente. Os procedimentos estão descrito com clareza e são adequados à proposta do estudo. Os riscos e desconfortos associados à punção venosa são mínimos. Foi apresentado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que está adequado aos propósitos desde estudo. Foi apresentado um valor de orçamento total de R\$ 30.000,00. O projeto prevê o armazenamento de material biológico humano.

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

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

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, assim como todos os anexos incluídos, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, da 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



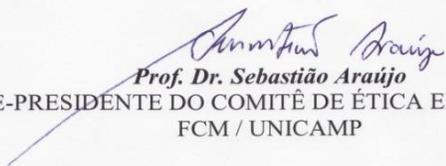
centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

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 VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.


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



CEP, 25/08/09.
(PARECER CEP: Nº 528/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DA PRESENÇA DE POLIMORFISMOS NOS GENES MODIFICADORES ACE, GCLC, GST (M1, T1 E P1) E NOS-1 EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM A GRAVIDADE APRESENTADA NO QUADRO CLÍNICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fernando Augusto de Lima Marson

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui 156 pacientes acompanhados no Ambulatório de Insuficiência Respiratória Crônica da UNICAMP e altera o título para: “ASSOCIAÇÃO DA GRAVIDADE DA FIBROSE CÍSTICA COM OS POLIMORFISMOS NOS GENES MODIFICADORES AC, GCLC, GST (M1, T1, E P1) E NOS-1”, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de agosto de 2009.


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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

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