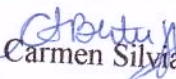


**ELISANGELA JACINTO DE FARIA**

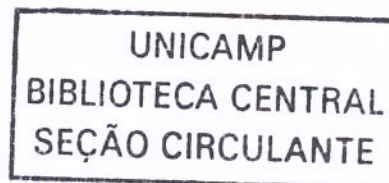
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas área de Ciências Biomédicas da aluna **Eli-sangela Jacinto de Faria**  
Campinas, 30 de agosto de 2002.

Profa. Dra.  Carmen Sylvia Bertuzzo  
Orientadora

**ANÁLISE DOS ALELOS S E Z DA  
ALFA 1 ANTITRIPSINA EM UMA AMOSTRA  
DE PACIENTES FIBROCÍSTICOS**

**CAMPINAS**

**2002**



200307285

**ELISANGELA JACINTO DE FARIA**

**ANÁLISE DOS ALELOS S E Z DA  
ALFA 1 ANTITRIPSINA EM UMA AMOSTRA  
DE PACIENTES FIBROCÍSTICOS**

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

**ORIENTADORA: CARMEN SÍLVIA BERTUZZO**

**CAMPINAS**

**2002**

---

# **Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

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

---

---

## **Membros:**

---

**1. Dr(a). Carmen Sílvia Bertuzzo**

---

**2. Dr Antônio Fernando Ribeiro**

---

**3. Dr(a). Marilda de Souza Gonçalves**

---

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

---

**Data: 30/08/2002**

---

***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais, Eurides e Neide.*

*À minha irmã, Isabel.*

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, por ter acreditado em mim e nesse projeto, tornando-o realidade.

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro e ao Dr. Alfonso Eduardo Alvarez, pela colaboração na classificação do quadro pulmonar dos pacientes.

Ao Dr. Antonio Fernando Ribeiro e à Dra. Marilda de Souza Gonçalves, pelas sugestões e disponibilidade.

Ao Dr. Leo, pela coleta de sangue dos pacientes.

Aos colegas do laboratório, pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

À minha irmã, pela ajuda e companheirismo.

Aos meus pais, sempre me incentivando com seu exemplo e amor.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

|                                                         | <b>PÁG.</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                      | <i>xii</i>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                    | <i>xiv</i>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                               | 16          |
| 1.1. Considerações iniciais.....                        | 17          |
| 1.2. A Alfa 1 antitripsina.....                         | 17          |
| 1.3. Estrutura da Alfa 1 antitripsina.....              | 19          |
| 1.4. O gene da Alfa 1 antitripsina.....                 | 22          |
| 1.5. Os alelos da Alfa1 antitripsina.....               | 26          |
| 1.6. Alelo Z.....                                       | 27          |
| 1.7. Alelo S.....                                       | 30          |
| 1.8. Doença pulmonar na deficiência da A1AT.....        | 31          |
| 1.9. A Fibrose Cística.....                             | 31          |
| 1.9.1. Histórico.....                                   | 31          |
| 1.9.2. Características clínicas da Fibrose Cística..... | 32          |
| 1.9.3. O gene da Fibrose Cística e a proteína cftr..... | 34          |
| 1.9.4. Mutações do gene <i>CFTR</i> .....               | 36          |
| 1.9.5. A doença pulmonar na Fibrose Cística.....        | 39          |
| 1.9.6. Correlação genótipo – fenótipo.....              | 39          |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                | 41          |

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>                | <b>43</b> |
| 3.1. Extração de DNA de sangue periférico.....     | 47        |
| 3.2. Amplificação gênica.....                      | 48        |
| 3.3. Mutação S.....                                | 49        |
| 3.4. Mutação Z.....                                | 53        |
| 3.5. Detecção das mutações.....                    | 57        |
| 3.5.1. Digestão com a enzima XMNI – mutação S..... | 57        |
| 3.5.2. Digestão com a enzima TAQI – mutação Z..... | 58        |
| 3.6. Escore de Shwachman.....                      | 59        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>                          | <b>60</b> |
| 4.1. Distribuição dos resultados.....              | 61        |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>                           | <b>67</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>                           | <b>71</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>          | <b>73</b> |
| <b>8. OBRAS CONSULTADAS.....</b>                   | <b>84</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>                              | <b>87</b> |

|                        |                                                                      |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>A1AT</b>            | Alfa1 antitripsina                                                   |
| <b>BSA</b>             | soro albumina bovino                                                 |
| <b>CFTR</b>            | Proteína reguladora de conductância transmembrana da fibrose cística |
| <b>DA1AT</b>           | Deficiência da Alfa1 antitripsina                                    |
| <b>dNTP</b>            | desoxirribonucleotídeos                                              |
| <b>DLN</b>             | domínio de ligação a nucleotídeo                                     |
| <b>EDTA</b>            | ácido etilenodiaminotetracético                                      |
| <b>ES</b>              | Escore de Shwachman                                                  |
| <b>FC</b>              | fibrose cística                                                      |
| <b>Kb</b>              | quilobases                                                           |
| <b>pb</b>              | pares de bases                                                       |
| <b>PCR</b>             | Reação em cadeia da polimerase                                       |
| <b>RNA<sub>m</sub></b> | Ácido ribonucleico mensageiro                                        |
| <b>TBE</b>             | tampão Tris –Borato- EDTA                                            |

|                                                                                                                                                                                          | <i>PÁG.</i> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Tabela 1:</b> Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos com o genótipo $\Delta F508/\Delta F508$ ..... | 61          |
| <b>Tabela 2:</b> Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos com o genótipo $\Delta F508/-$ .....           | 62          |
| <b>Tabela 3:</b> Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos que tinham outras mutações.....                | 63          |
| <b>Tabela 4:</b> Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes homozigotos para $\Delta F508$ .....                                                                     | 65          |
| <b>Tabela 5:</b> Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes portadores de um alelo para $\Delta F508$ .....                                                          | 65          |
| <b>Tabela 6:</b> Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes sem a mutação $\Delta F508$ .....                                                                        | 66          |
| <b>Tabela 7:</b> Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em todos os pacientes independente da mutação $\Delta F508$ .....                                                     | 66          |

|                                                                            | <b>PÁG.</b> |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1:</b> Proteína A1AT.....                                        | 20          |
| <b>Figura 2:</b> Interação entre a elastase de neutrófilos e a A1AT.....   | 21          |
| <b>Figura 3:</b> Gene da A1AT.....                                         | 23          |
| <b>Figura 4:</b> Organização genômica do gene da A1AT.....                 | 24          |
| <b>Figura 5:</b> Estrutura do gene da A1AT.....                            | 25          |
| <b>Figura 6:</b> Estrutura da proteína A1AT (mutação Z ).....              | 28          |
| <b>Figura 7:</b> Polímeros de A1AT.....                                    | 29          |
| <b>Figura 8:</b> Proteína CFTR.....                                        | 35          |
| <b>Figura 9:</b> Distribuição das mutações no gene CFTR.....               | 38          |
| <b>Figura 10:</b> Estratégia para detecção do alelo S do gene da A1AT..... | 52          |
| <b>Figura 11:</b> Estratégia para detecção do alelo Z do gene da A1AT..... | 56          |
| <b>Figura 12:</b> Gel de poliacrilamida para mutação do alelo S.....       | 57          |
| <b>Figura 13:</b> Gel de poliacrilamida para a mutação do alelo Z.....     | 58          |

|                                                                                                                                                                                | <b>PÁG.</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Gráfico 1:</b> Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do ambulatório de Fibrose Cística do departamento de Pediatria da Unicamp, segundo o gênero.....       | 45          |
| <b>Gráfico 2:</b> Distribuição dos pacientes fibrocísticos provenientes do ambulatório de Fibrose Cística do departamento de pediatria da Unicamp, segundo o grupo étnico..... | 46          |
| <b>Gráfico 3:</b> Representação gráfica da distribuição dos vários genótipos para a A1AT presentes nos pacientes fibrocísticos.....                                            | 64          |



## *RESUMO*

A fibrose cística é uma alteração genética que cursa principalmente com manifestações pulmonares e pancreáticas. A correlação genótipo-fenótipo da fibrose cística é motivo de árduos estudos. Somente a correlação com a insuficiência pancreática foi encontrada. Percebeu-se, também, que o curso e a severidade da manifestação pulmonar não estão correlacionados com o genótipo CFTR.

A alfa1 antitripsina inibe as proteases que desencadeiam as reações inflamatórias do plasma. Seu papel inibitório mais importante é o que realiza contra a elastase leucocitária. Como a deficiência da alfa1 antitripsina tem uma manifestação pulmonar relevante e é freqüente em nosso meio, acredita-se que ela possa modular a manifestação pulmonar dos pacientes fibrocísticos. Neste estudo, todos os pacientes estavam sendo avaliados clínica e radiologicamente de acordo com sua evolução clínica, aspectos radiológicos, prova de função pulmonar e saturação de oxigênio.

Dos 70 pacientes avaliados, 17 tinham os dois alelos para a mutação  $\Delta F508$ , 26 pacientes tinham um alelo para  $\Delta F508$  e 27 pacientes não apresentavam a mutação  $\Delta F508$ . Destes pacientes fibrocísticos, sete apresentam um alelo S (10%), um apresenta um alelo Z (1,43%) e um apresenta os dois alelos SZ (1,43%).

Os genótipos comuns MS, SS, MZ da deficiência da A1AT, que conduzem a uma deficiência leve para moderada da proteína, não estão associados com a piora da doença pulmonar em pacientes com fibrose cística.



## *ABSTRACT*

Cystic fibrosis is a genetic disorder that during its course presents mainly pulmonary and pancreatic manifestations. Its genotype-phenotype correlation has motivated many arduous studies. The only correlation so far encountered is with pancreatic insufficiency. It has also been noted that the course of the disease as well as the severity of its pulmonary manifestations did not demonstrate correlation with CFTR genotype.

Alpha 1 antitripsin inhibits the proteases that release inflammatory reactions of the plasma. Its most important inhibitory role is its action against leukocytic elastase. As the deficiency of alpha 1 antitripsin has relevant pulmonary manifestations and is very common in the area, we believe that it may be able to modulate pulmonary manifestations in fibrocystic patients. All the patients in the study were clinically and radiologically evaluated in accordance with their clinical evolution, pulmonary function and oxygen saturation tests.

Out of the 70 patients evaluated, 17 patients had two alleles for the  $\Delta F508$  mutation, 26 patients had one allele for the  $\Delta F508$  mutation and 27 patients did not present the  $\Delta F508$  mutation. Among the fibrocystic patients, seven patients presented one S allele (10%), one patient presented one Z allele (1.43%) and one patient presented the two Z alleles (1.43%).

The common MS, SS, MZ genotypes of A1AT deficiency that cause discreet to moderate protein deficiency are not associated with lung disease deterioration in patients with cystic fibrosis.



## ***1. INTRODUÇÃO***

## 1.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

LAURELL e ERIKSSON (1963) descreveram a ausência da alfa 1 antitripsina do plasma em pacientes com uma doença pulmonar degenerativa.

FAGERHOL (1968) sugeriu o símbolo Pi (agora PI), que são os inibidores de proteases para os polimorfismos de A1AT.

Em 1969, SHARP et al. notaram que a deficiência de A1AT foi associada com doença de fígado em crianças.

Em 1983, LAI et al. clonaram o gene da alfa1 antitripsina.

A estrutura molecular da A1AT foi relatada por LOBERMANN (1984).

## 1.2. A ALFA 1 ANTITRIPSINA

As proteases séricas são enzimas estreitamente relacionadas e responsáveis pelo desencadeamento das reações inflamatórias do plasma tais como fibrinólise coagulação e ativação do complemento. Esse desencadeamento é, por seu lado, controlado por um grupo especializado de inibidores das proteases do plasma que pertencem a uma mesma família protéica (Serpín) sendo seus membros derivados de um gene ancestral comum e que guarda semelhanças quer na estrutura do gene ou na sequência de aminoácidos, quer na estrutura protéica terciária (SIFERS et al. 1992). Dentro desse grupo destaca-se a Alfa-1-Antitripsina (A1AT) que é o inibidor presente em maior concentração no plasma humano. A A1AT humana é uma glicoproteína de 52 Kda, que consiste de uma cadeia polipeptídica de 394 aminoácidos. Embora sua principal fonte de produção sejam os hepatócitos, ela é também produzida em menor quantidade, pelos monócitos e macrófagos alveolares que talvez desempenhem papel importante na regulação local da defesa dos tecidos (CARREL, 1986; COHEN et al. 1990). Essa proteína é sintetizada no fígado, com um mRNA de 1,75 Kb, que posteriormente é traduzido e liberado no retículo endoplasmático rugoso. Forma-se uma proteína precursora de 418 aminoácidos contendo um polipeptídeo sinal de 24 resíduos. No seu processamento, essa proteína precursora recebe, nos seus três resíduos de

Asparagina (Asn 46, Asn 83, Asn247), carboidratos. Em seguida, a proteína segue para o retículo endoplasmático liso quando então os carboidratos são retirados e adicionado o ácido siálico. Finalmente, a proteína glicosilada é secretada na forma de proteína madura com 394 aminoácidos (FABBRETTI et al. 1992).

Como inibidor no plasma humano, a A1AT pode formar complexos com grande espectro de proteases, incluindo a elastase, tripsina (de onde vem seu nome), quimiotripsina, trombina e proteases bacterianas, dentre outras. Porém, seu papel inibitório mais importante é o que realiza contra a elastase leucocitária, uma protease que degrada a elastina das paredes alveolares bem como outras proteínas estruturais de vários tecidos (COX et al. 1985).

Com uma massa molecular de 52 Kda, ela se difunde pela maioria dos tecidos na superfície epitelial do trato respiratório inferior, seus níveis são de 3-4 uM, aproximadamente 10% dos níveis séricos e nesse local ela leva 0,2 segundos para inibir quantidade igual de elastase (OGUSHI et al. 1988). A vida média da A1AT no sangue é de 4-5 dias e sua produção é de cerca de 34 mg/Kg de peso corpóreo/dia (JONES et al. 1985). A A1AT se associa com a elastase neutrofílica cerca de 6.000 vezes mais rapidamente do que com a tripsina; 150 vezes mais rapidamente do que com a Catepsina G e cerca de 10 vezes mais rapidamente do que com a quimiotripsina.

É importante ressaltar que a A1AT pode ser inativada devido à oxidação por radicais contidos na fumaça de tabaco, bem como pelos radicais oxigênio liberados por neutrófilos estimulados. A metionina do centro reativo contém um átomo de enxofre que é rapidamente oxidado gerando um derivado cuja conformação não mais irá se ajustar ao centro ativo da elastase, ficando assim a A1AT inativada como inibidor da elastase neutrofílica.

A A1AT tem a capacidade de responder a estímulos externos com o aumento da síntese como ocorre em condições inflamatórias, no câncer e nas doenças hepáticas (FAGERHOL e COX, 1981). Poderá também ocorrer elevação de seus níveis durante terapia com estrógenos ou durante a gravidez (LAURELL et al. 1968). Além disso, níveis baixos de A1AT no soro são observados nos estados deficientes enzimáticos, bem como na

síndrome do distress respiratório em recém-nascidos, em situações de grande perda protéica, na fase terminal de falência hepática e durante o curso da fibrose cística (FAGERHOL e COX, 1981).

A concentração média de A1AT no plasma de indivíduos normais é estimada em 1,3 mg/ml (JEPPSSON et al. 1978). Porém, a concentração varia de acordo com os tipos PI. Sua concentração plasmática pode ser medida por métodos funcionais ou imunoquímicos (COX, 1994).

### 1.3. ESTRUTURA DA PROTEÍNA A1AT

A análise por cristalografia de raio X da proteína, revela uma estrutura globular que contém nove hélices alfa e três folhas beta (STRATIKOS e GETTINS, 1997). (Figura 1)

No lado oposto da molécula, existe uma alça com um sítio ativo para a inibição de proteases. Na ponta da alça existe uma metionina na posição 358 e uma serina na posição 359. Este mecanismo é que vai interagir entre elastase de neutrófilos e a A1AT (LOBERMANN et al. 1984). (Figura 2).

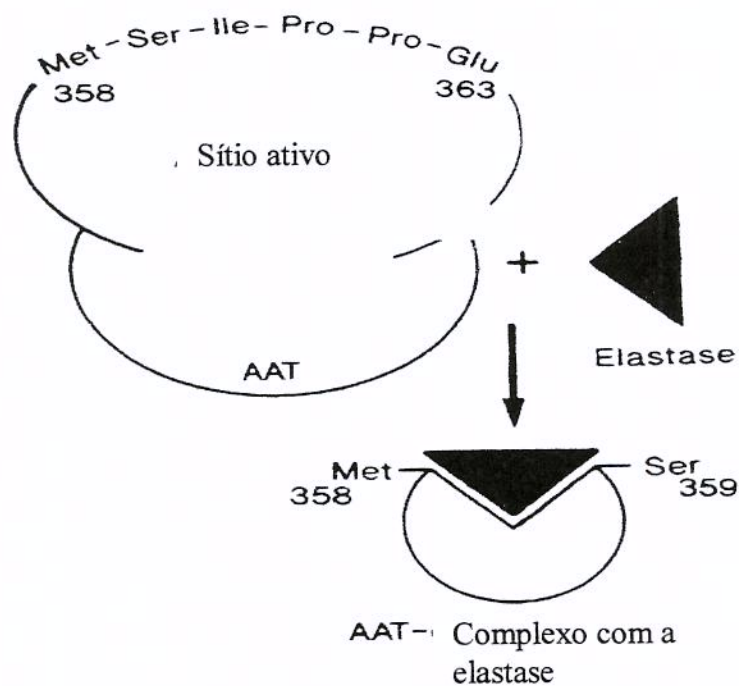
A alça do centro ativo da proteína age com o pseudosubstrato para inibir o alvo da proteinase. Após a ligação, a proteinase é inativada pela formação do complexo e é despejada da circulação (MAST et al. 1991).

A mobilidade conformacional proporcionou vantagens para as serpins, e elas tornaram-se predominantemente inibidoras de proteases no plasma humano. Essas vantagens permitiram uma evolução de mecanismos para a modulação da ação inibitória (CARREL et al. 1996).

A desvantagem de se ter o mecanismo de mobilidade molecular é o fato de tornar as serpins mais vulneráveis à mutações disfuncionais. Particularmente, podem ocorrer mutações que afetam o domínio inicial de mobilidade da molécula, que podem impedir mudanças na conformação e portanto causar a perda da atividade inibitória ou, alternadamente, mutações que podem permitir mudanças espontâneas e inapropriadas na conformação (STEIN e CARREL, 1995).



**Figura 1- Proteína A1AT** – A1AT (representada na cor amarela) se ligando a protease (representada na cor cinza) através de sua alça no centro ativo (representada na cor vermelha) (MAHADEVA e LOMAS,1998).



**Figura 2- Interação entre a elastase de neutrófilos e a A1AT** - O centro ativo está em uma alça exposta da molécula e depois da clivagem os resíduos de metionina e serina situam-se em pólos opostos da molécula (KALSHEKER e MORGAN, 1990).

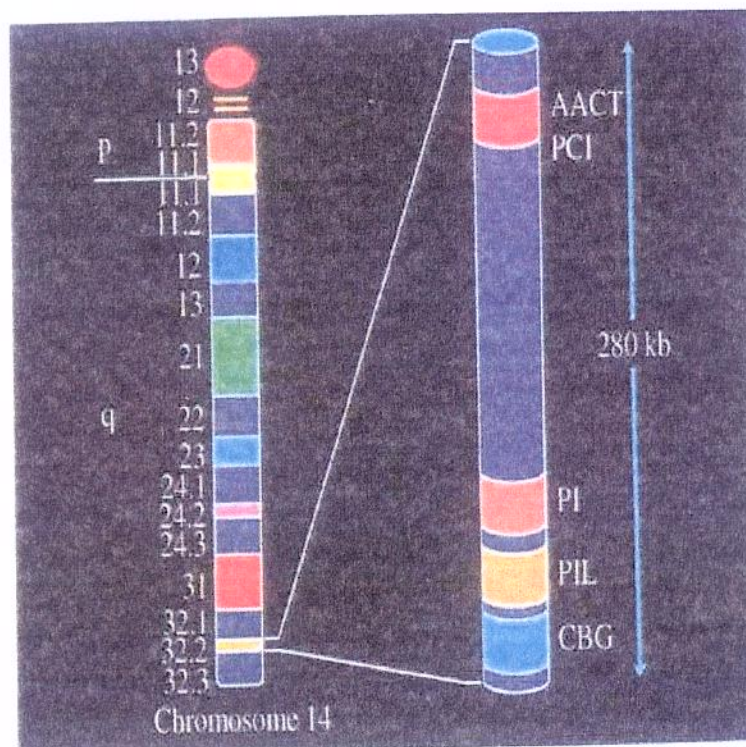
#### 1.4. O GENE A1AT

O gene que codifica a proteína A1AT se encontra em um segmento de DNA de 12,2 Kb, contendo 7 éxons separados por 6 íntrons no cromossomo 14, na região 14q 32.1 dentro de um cluster de 280 Kb de genes denominados de Serpin (Inibidores de proteases séricas) (SEFTON et al. 1990; BILLINGSLEY et al. 1993). (Figura 3). Os éxons IA, IB e IC não codificam proteína, contém seqüências encontradas no mRNA da A1AT enquanto toda a informação estrutural para a proteína é codificada pelos outros 4 éxons (Figura 4).

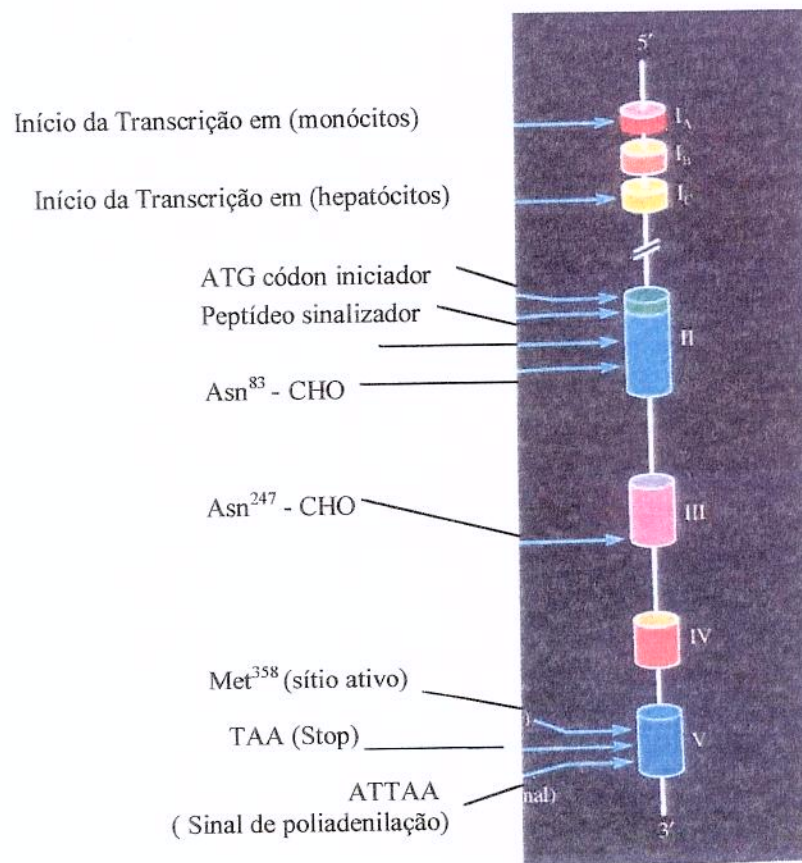
O gene da A1AT é normalmente expresso em duas classes de células: hepatócitos e fagócitos mononucleares. (Figura 5). A maioria das informações para controlar a expressão do gene da A1AT é relatada para a expressão de hepatócitos (PELMUTTER et al. 1989).

Em monócitos, a transcrição começa no éxon IA. Em hepatócitos a transcrição começa no éxon IC. Os éxons II e III codificam as asparaginas que estão ligadas a carboidratos. No éxon V, o gene codifica a metionina, que está presente no centro ativo da proteína (LEE e BRANTLY, 2000).

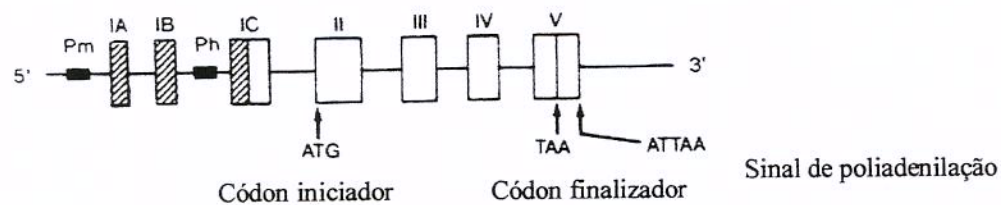
O RNAm produzido por monócitos difere do que é produzido pelos hepatócitos, pois contém éxons adicionais (PERLINO et al. 1987).



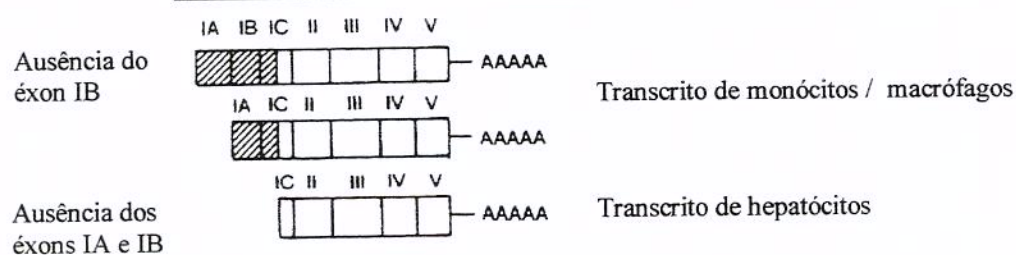
**Figura 3- Gene da A1AT** - sua localização dentro de um cluster de genes: gene da alfa1 antitripsina (AACT), gene inibidor da proteína C (PCI), gene da A1AT (PI), pseudogene da A1AT(PIL), gene da globulina de ligação ao corticosteróide (LEE e BRANTLY, 2000).



**Figura 4- Organização genômica do gene da A1AT (LEE e BRANTLY, 2000).**



#### Processamento de RNAm / com transcritos alternativos



**Figura 5 – Estrutura do gene da Alfa 1 antitripsina.** Pm e Ph representam monócitos e hepatócitos com suas regiões promotoras. O RNAm de monócitos e hepatócitos são mostrados abaixo (KALSHEKER e MORGAN, 1990).

## 1.5. OS ALELOS DA A1AT

É importante ressaltar que o gene codificador da A1AT é altamente polimórfico, existindo hoje mais de 75 variantes protéicas, a maioria classificada pelo Sistema Inibidor de proteases (PI) que agrupa cada variante de acordo com posição alcançada no gel de focalização isoeletrica. Os alelos são designados com letras do alfabeto (A-Z) de acordo com seu ponto isoeletrico. Os subtipos comuns são indicados com números seguindo a designação das letras. Todos os alelos raros (incluindo os alelos nulos, alelos M deficientes e alelos compostos de variações de DNA silenciosas) são também designados com o local de nascimento do primeiro portador conhecido (BRANTLY et al. 1988). Em alguns casos, certas variantes são identificadas apenas pela análise de RFLP do DNA genômico bem como pelo seqüenciamento dos alelos (COX et al. 1985; NUKIWA et al. 1987).

Dessa forma, de acordo com os níveis séricos, os alelos da A1AT são caracterizados em :

**1- Alelos normais** – dentre os vários alelos existentes, os mais comuns são os do grupo M (M1, M2, M3...) que codificam, cada um, uma proteína diferente porém de função normal. Estão associados a níveis séricos normais (150-350mg/dl). Esses subtipos de PI M são responsáveis por cerca de 95% dos alelos na maioria das populações humanas (COX et al. 1985).

**2- Alelos deficientes** – são aqueles que quando herdados em homozigose estão associados a níveis séricos de A1AT inferior a 35% do normal. Neste agrupamento encontra-se a maioria das variantes de importância clínica, tais como os alelos S e Z (CARLSON et al. 1989). São seis tipos de genótipos : ZZ, SZ, MZ, SS, MS, e MM, que apresentam concentração de alfa 1 antitripsina no plasma: 16%, 51%, 83%, 93%, 97% e 100%, respectivamente (BRANTLY et al. 1991).

**3- Alelos nulos** – são alelos raros que produzem menos que 1% da concentração normal da proteína no plasma, ou mesmo nenhuma. Juntos representam menos que 1% de todos os alelos da A1AT (TAKAHASHI e CRYSTAL, 1990).

**4 - Alelos disfuncionais** – são alelos que produzem quantidade normal de proteína, porém com atividade inibitória de elastase diminuída. Como exemplo a proteína Pittsburgh, que resultou da substituição de uma metionina na posição 358 por arginina (SCOTT et al. 1986).

## 1.6. ALELO Z

A variante Z originou-se de uma mutação no éxon V do gene da A1AT, onde uma guanina na posição 9985 do gene foi substituída por uma adenina (G<sup>9985</sup> para a A), ocasionando a troca do ácido glutâmico na posição 342 da cadeia polipeptídica pela lisina. Essa troca impossibilita a formação de uma ponte de sal entre esse mesmo ácido glutâmico e uma outra lisina, e interfere na estabilidade da molécula da proteína.

O fenótipo ZZ é visto predominantemente nas populações do Norte da Europa. É raro no Sul da Europa, Ásia e nas populações negras (MAHADEVA e LOMAS, 1998).

Na população caucasóide dos EUA, o alelo Z atinge a frequência de 0,014 (COX, 1994). No estudo realizado por PAGGOTO (1993), na população do estado de São Paulo esse alelo atingiu a frequência de 0,03.

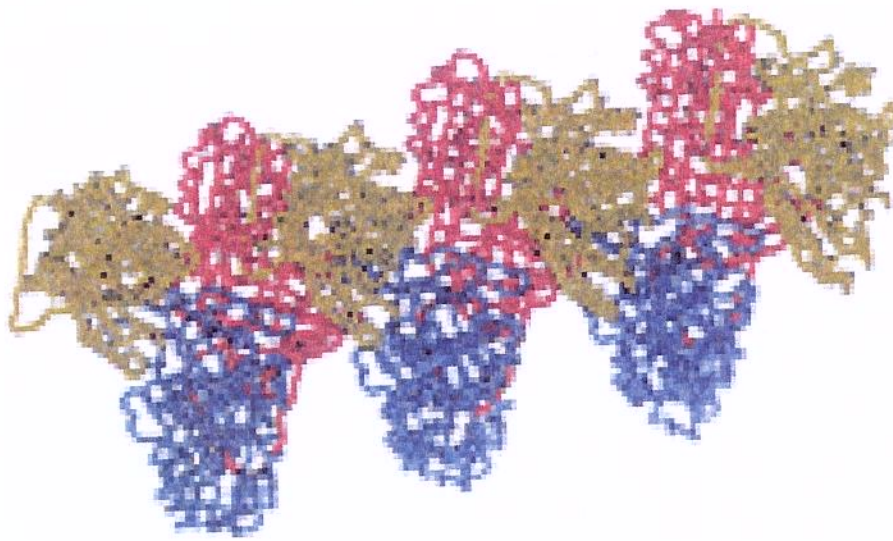
É estabelecido que a deficiência grave da A1AT, relacionada ao alelo ZZ, lidera uma obstrução crônica pulmonar e morte, particularmente em fumantes (BUIST e VOLLMER, 1994).

A mutação Z da DA1AT está presente no resíduo P17 (17 resíduos próximos do centro ativo P1) da proteína (Figura 6). A mutação abre estruturas internas da proteína como as folhas beta, favorecendo a inserção da alça do centro ativo de uma segunda molécula de A1AT para formar um dímero. Esse processo pode se estender para formar polímeros (Figura 7). Esses polímeros ficam emaranhados no retículo endoplasmático rugoso do fígado para formar corpúsculos de inclusão, que são formados pela agregação de moléculas de proteína mutante (ELLIOTT et al.1996).

O processo de polimerização da proteína também pode ocorrer através do aumento da temperatura para 41 graus Celsius e pode ser bloqueado pelos peptídeos que competem com a alça para o anelamento das folhas beta (LOMAS et al. 1992). A função da polimerização foi esclarecida pelo achado de polímeros de alfa1 antitripsina em corpúsculos de inclusão no fígado de homozigotos para o alelo Z.



**Figura 6- Estrutura da proteína A1AT (mutação Z) - A posição (P17) da mutação Z da alfa1 antitripsina é mostrada (CARREL et al. 1994).**



**Figura 7- Polímeros de A1AT** – Cada cor representa uma molécula de A1AT diferente. A mutação Z favorece a formação de cadeias longas de polímeros que ficam acumuladas no fígado (ELLIOTT et al. 1996).

## 1.7. ALELO S

Segundo JUGEND (1980), o alelo S é o segundo mais freqüente em todas as populações do mundo, perdendo apenas para o alelo M (M1 + M2 + M3). Nas populações brancas dos Estados Unidos da América, essa variante gênica atinge valores de freqüência de 0,02 a 0,03 (COX, 1994).

O alelo S predomina em mais que 25% no Sul da Europa (KALSHEKER e MORGAN, 1990). Entretanto, de maneira semelhante à mutação Z, a mutação S é raramente observada entre negróides e orientais da população mundial. Na população do estado de São Paulo, o alelo S alcança freqüência de 0,05 (PAGGOTO, 1993).

O alelo S tem seqüência de éxons igual ao do alelo M1(Val<sup>213</sup>), com exceção de um códon localizado no éxon III do gene, onde ocorreu a substituição de uma adenina por timina e a conseqüente troca de ácido glutâmico, na posição 264 da cadeia polipeptídica, por valina. Assim como a mutação que deu origem ao alelo Z, essa mutação modifica a arquitetura interna da proteína e está associada à quantidade normal de RNAm. A diferença entre as duas proteínas mutantes está no fato de que algumas das moléculas S recém-sintetizadas são degradadas nos lisossomos antes de serem glicosiladas (CRYSTAL et al. 1991).

O ponto da mutação, que é responsável pela variante S, tem um efeito menor nas regiões da folhas beta que o da variante Z. Então a razão da formação de polímeros na variante S é muito mais lenta que na variante Z, a qual resulta em uma retenção menor da proteína dentro dos hepatócitos, uma deficiência leve da proteína no plasma e a falta de um fenótipo clínico. Mas se a polimerização lenta da variante S for herdada juntamente com a polimerização rápida da variante Z, então as duas podem interagir, formando heteropolímeros dentro dos hepatócitos, inclusão e cirrose (MAHADEVA et al. 1999).

## **1.8. DOENÇA PULMONAR NA DEFICIÊNCIA DA ALFA 1 ANTITRIPSINA**

Indivíduos homozigotos para DA1AT e fumantes desenvolvem enfizema pulmonar.

Crianças e adolescentes com a DA1AT não apresentam anormalidades significantes na função pulmonar (SVEGER et al. 1994). Depois dos 30 e 35 anos, há um declínio acelerado do volume de força expiratória em um segundo (FEV1 ), o qual é considerado pior em fumantes. Em não fumantes, os sintomas são geralmente vistos por volta dos 50 anos de idade.

## **1.9. A FIBROSE CÍSTICA**

### **1.9.1 Histórico**

Os conhecimentos de fisiopatologia e epidemiologia da fibrose cística foram progressivamente conhecidos no século XX.

LANDSTEINER, em 1905, realizou a primeira descrição anatomopatológica da fibrose cística em recém-nascidos falecidos no quinto dia de vida por íleo meconial.

FANCONI et al., em 1936, descreveram o caso de uma criança com síndrome celiaca com alterações pancreáticas e que apresentava sintomas pulmonares e intestinais.

Em 1938, ANDERSEN formulou a hipótese da etiologia da doença e propôs uma padronização de seu tratamento, tornando a doença conhecida nos países de língua inglesa. Esta publicação é considerada um marco no estudo da fibrose cística.

Posteriormente FARBER (1945) notou que os pacientes com fibrose cística sofriam de obstrução causada por muco em uma série de órgãos, e propôs a hipótese de que o muco espesso era consequência de estímulo excessivo parassimpático e que a secreção anômala assim produzida era responsável pelas lesões pulmonares e pancreáticas, designando pela primeira vez o termo 'mucoviscidose'. Nesse período, ANDERSON e HODGES (1946) sugeriram o padrão autossômico recessivo de herança da doença.

Em 1953, DI SANT' AGNESE et al., pesquisaram a depleção de sal em crianças com fibrose cística durante uma onda de calor no verão; eles concluíram que a perda excessiva de sal ocorria pelo suor. Subseqüentemente, tais pesquisadores documentaram que os níveis de sódio e cloro no suor são elevados em todos os indivíduos com fibrose cística.

Dois conjuntos de observações no início da década de 80 foram importantes para o rápido entendimento do defeito molecular ligado à fibrose cística. Primeiramente, KNOWLES et al. (1981) descreveram alterações nas propriedades elétricas do epitélio respiratório 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. Estas observações determinaram um papel patogênico para o movimento de água e eletrólitos pelo epitélio fibrose cística e, pela primeira vez, ofereceram explicação plausível tanto para o déficit de água nas secreções mucosas ( responsável pela obstrução de glândulas exócrinas), quanto para a disfunção de múltiplos órgãos.

Em 1989, o gene responsável pela fibrose cística foi clonado (ROMMENS, 1989; RIORDAN, 1989; KEREM et al. 1989). Logo tornou-se claro que seu produto, a proteína CFTR, era de fato um canal de cloro defeituoso no epitélio da fibrose cística (BEAR et al. 1992).

### **1.9.2. Características clínicas da fibrose cística**

A fibrose cística é a mais comum e letal das doenças genéticas autossômica recessiva na população de origem caucasóide. Com a freqüência de portadores de 1 para 25. Sua incidência é de aproximadamente 1:2500 nascimentos vivos e tem uma esperança média de vida de 28 anos (DAVIS et al. 1996).

A fibrose cística é essencialmente uma doença pós-natal, com poucas manifestações clínicas ao nascimento, como íleo meconial, vólvulos, atresia ou amputação intestinal, resultante da secreção intestinal anormal de muco. A gestação de crianças

afetadas pela fibrose cística é de duração normal. Apenas o peso ao nascimento é levemente reduzido (BOYER et al. 1955). Em geral, a doença não se manifesta antes do nascimento e mesmo naqueles casos em que alguma manifestação ocorre o desenvolvimento do feto é normal.

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

Nas glândulas sudoríparas a proteína CFTR está envolvida na reabsorção do cloro a partir do suor (QUINTON, 1990). A inibição desta reabsorção e o resultante efluxo compensatório de sódio explicam o suor salgado da FC (BOUCHER et al. 1986).

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

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

A infertilidade é um sintoma comum nos pacientes, principalmente nos homens (98% dos homens fibrocísticos são estéreis), ocorre azoospermia devido à obstrução dos vasos deferentes e dos túbulos do epidídimo (KOCH e LANNG, 1995).

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

O pulmão difere da maioria de outros órgãos afetados na Fibrose Cística. As complicações respiratórias se caracterizam por infecções bacterianas recorrentes e inflamação, as quais são responsáveis por mais de 90% da morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (TEBBUTT et al. 1998).

A doença pulmonar característica da FC é obstrutiva crônica estando associada ao espessamento das secreções mucosas. Infecções recorrentes e persistentes no trato respiratório, especialmente as causadas por *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, podem resultar em bronquiectasia e insuficiência respiratória (Korst et al., 1995). Aproximadamente 80% dos pacientes com FC adquirem a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, que resulta em perda progressiva da função pulmonar levando à morte (DEMKO et al. 1995).

### 1.9.3. O gene da fibrose cística e a proteína CFTR

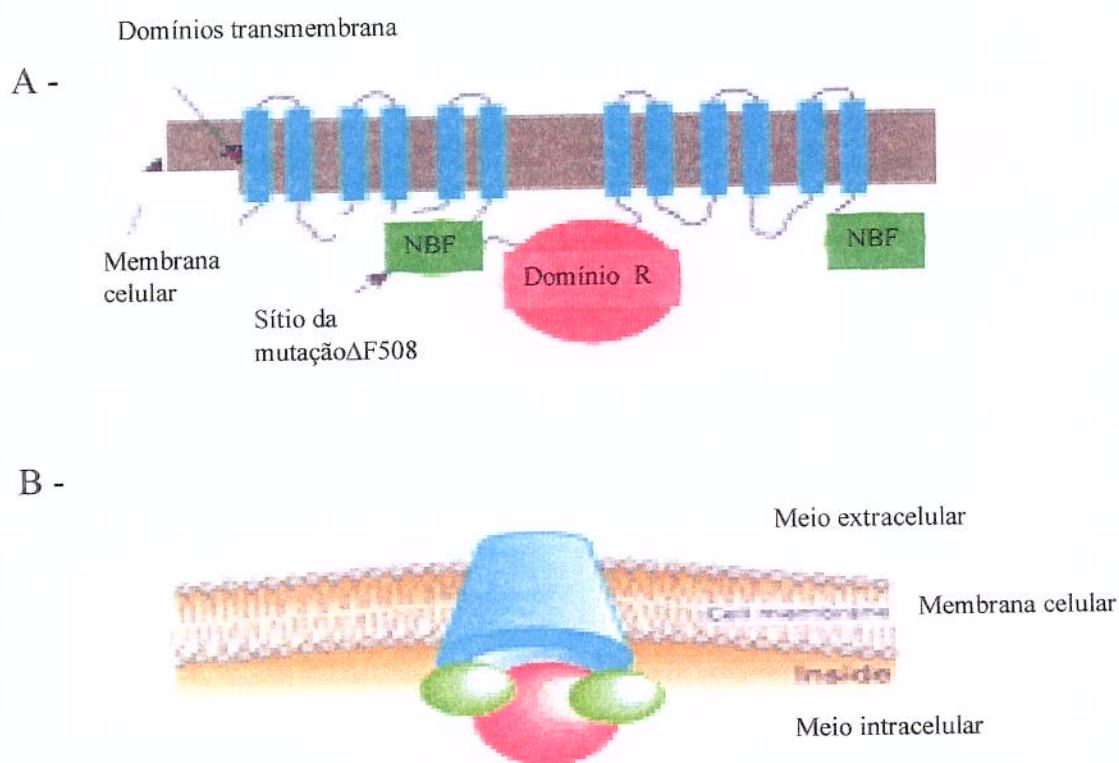
O gene responsável por essa anormalidade foi localizado no cromossomo 7, região q.31 e finalmente clonado por meio da "Genética reversa" (ROMMENS, 1989). Análises de seqüências de DNA e estudos comparativos de seqüências deduzidas de aminoácidos revelam diversas homologias com proteínas de membrana celular,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

A proteína CFTR possui 1480 aminoácidos, com uma massa molecular de 168.138 daltons. Sua estrutura básica 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 dois segmentos 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 cinase A e C e N-glicosilase (RIORDAN, 1989) (Figura 8 ).

A sequência de ativação dos canais de Cl dá-se do seguinte modo:

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

O defeito básico está associado à diminuição da condução de íons Cl através da membrana apical de células epiteliais. A redução da permeabilidade ao cloro reduz a secreção de fluidos e eletrólitos, resultando em desidratação luminal.



**Figura 8 – PROTEÍNA CFTR**

(A)- Diferentes domínios de função da proteína cfr

(B)- Estrutura da proteína cfr na membrana celular

(SOUTHERN, 1997)

As mutações que causam FC são classificadas em cinco classes baseadas na disfunção da proteína cfr: (ZEITLIN, 1999)

**Classe I** – Mutações que causam defeito na síntese da cfr resultando na ausência da produção da cfr. Portanto não vai ocorrer a síntese protéica. Exemplo: a mutação nonsense G542X.

**Classe II** – Mutações em que se têm a produção anormal de cfr, a qual então falha em escapar para o retículo endoplasmático. Essas mutações afetam o processamento da proteína. Como exemplo a mutação missense N1303K e a deleção  $\Delta F508$ .

**Classe III** – Mutações em que se têm a produção de cfr e o tráfico intracelular, mas há uma interrupção na ativação e regulação na membrana celular. Essas mutações resultam em falhas na regulação do canal, e como exemplo tem-se a mutação missense G551D.

**Classe IV** – São mutações em que a cfr é expressa na membrana celular, mas a condução do cloro é reduzida. Essas mutações mostram uma condução defeituosa através do canal, como as mutações missense R117H e R347P.

**Classe V** – O processamento da cfr é normal, porém em quantidade reduzida. Como exemplo tem-se a mutação de splicing 3849+10kbc  $\rightarrow$ T.

#### 1.9.4. Mutações do gene CFTR

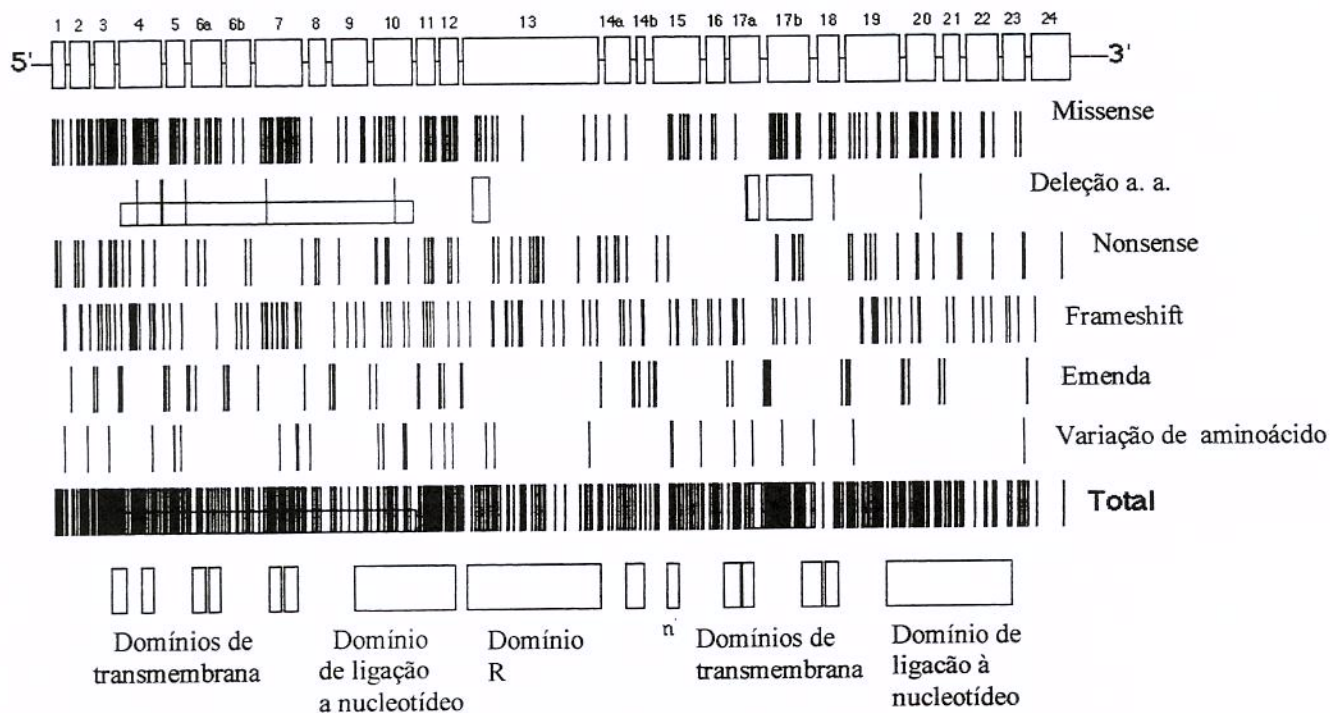
Um total de 27 exons foram identificados no gene CFTR (ZIELENSKI, 1991), três a mais do que originariamente descrito por RIORDAN, 1989. Dos éxons 9 a 12, englobando cerca de 150 aminoácidos, está codificado o primeiro NBF. Nessa região, no resíduo 508 da proteína, ocorre a mutação mais freqüente, a  $\Delta F 508$ , 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 prevalência dessa mutação varia de acordo com a população estudada. Assim, foram constatadas prevalências de 80% na Inglaterra, 70% na

América do Norte, (CHILLON et al. 1993), 67% na França (CHOMEL et al. 1990), 50% na Espanha, 42% na região de Verona, na Itália, e 27% na Turquia (CHILLON et al. 1993). Devido à importância dessa anomalia e à frequência elevada dessa mutação, foi feito um esforço conjunto de pesquisadores para um mapeamento dessa mutação no Continente Europeu (European Working Group, 1990).

Apesar da frequência elevada da mutação  $\Delta F508$ , + 1000 outras alterações gênicas foram descritas, a maioria nos exons 10 e 11. Nenhuma delas atinge prevalência tão alta como a  $\Delta F 508$ .

As mutações que teriam importância relativa devido à sua frequência seriam as: G542X (C→A), G551D (G→A), R553X (C→T), que ocorrem no exon 11 e N1303K (G→C) no exon 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 verificado a presença das cinco mutações:  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X e N1303K. Verificou-se que juntas perfazem cerca de 40% dos alelos mucoviscidóticos (26.03% -  $\Delta F508$ , 6.85% - G542X, 2.74% - N1303K, 2.05% - G551D e 0% - R553X) (PARIZOTTO, 1996).



**Figura 9: Distribuição das mutações no gene CFTR.** Os éxons está representados por boxes numerados e os domínios funcionais previstos estão denotados por boxes na parte inferior da figura. Cada barra vertical representa a localização de uma mutação documentada pelo Consórcio de Análise Genética da Fibrose Cística (FRIZZELL, 1995).

### **1.9.5. A doença pulmonar na fibrose cística**

O pulmão difere da maioria de outros órgãos afetados na FC. As complicações respiratórias se caracterizam por infecções bacterianas recorrentes e inflamação, as quais são responsáveis por mais que 90% da morbidade e mortalidade em pacientes com FC.

A produção excessiva de muco, a obstrução das vias aéreas, citocinas em que há o aumento nos níveis das interleucinas 8 (IL-8) e a redução nos níveis das interleucinas 10 (IL-10) no pulmão dos fibrocísticos (DAVIS et al. 1996), e o domínio de neutrófilos na resposta celular, produzem uma quantidade excessiva de elastase, ocasionando uma bronquiectasia severa (PUCHELLE et al. 1985). A elastase de neutrófilos enfraquece a defesa do hospedeiro contra a infecção por pseudomonas no pulmão. O avanço na resposta inflamatória destrói as vias aéreas, levando à morte (TOSI et al. 1990).

### **1.9.6. Correlação genótipo-fenótipo**

A correlação genótipo-fenótipo na Fibrose Cística é bastante complexa. Em 1993, foi criado um consórcio com 89 centros de pesquisa a fim de tentar elucidar essa relação do genótipo com o fenótipo em pacientes portadores da fibrose cística.

A relação com a insuficiência pancreática foi extremamente forte. Determinadas combinações de mutações cursam com insuficiência pancreática enquanto outras não (SANTIS et al. 1992).

(KEREM et al. 1990) sugeriram que um alelo leve (causa suficiência pancreática), dominaria sobre um alelo severo (causa insuficiência pancreática). Portanto, dois alelos severos seriam necessários para manifestar insuficiência pancreática.

A análise genótipo-fenótipo mostra uma boa relação entre a mutação  $\Delta F508$  e a insuficiência pancreática (ESTIVILL, 1996).

Percebeu-se também que o curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão relacionados com o genótipo CFTR. Esse achado veio de encontro a um estudo realizado em gêmeos mono e dizigóticos, em que se encontrou uma forte contribuição genética na doença pulmonar, sem contudo ser dependente do genótipo CFTR (SANTIS et al. 1992).

A doença pulmonar é influenciada por **fatores ambientais** como a idade do paciente, o estado pancreático, estado nutricional, história de fumo e colonização por bactérias (MAHADEVA e LOMAS, 2000).

Também pode ser influenciada por **fatores genéticos** como: variações de DNA em íntron, genes não identificados fora do locus da fibrose cística, uma segunda mutação no mesmo alelo que atenua o efeito da mutação principal (KEREM e KEREM, 1996; DORK et al. 1991; BIENVENU, 1997).

Com base nestes fatos, julga-se que, uma vez que os alelos S e Z da deficiência da alfa 1 antitripsina são freqüentes no estado de São Paulo, seria importante averiguar uma possível associação dessas duas entidades genéticas e a evolução pulmonar desses pacientes.



## ***2. OBJETIVOS***

Verificar em uma amostra de pacientes com fibrose cística a existência dos alelos S e Z da deficiência da Alfa 1 antitripsina, bem como correlacionar com o quadro pulmonar.

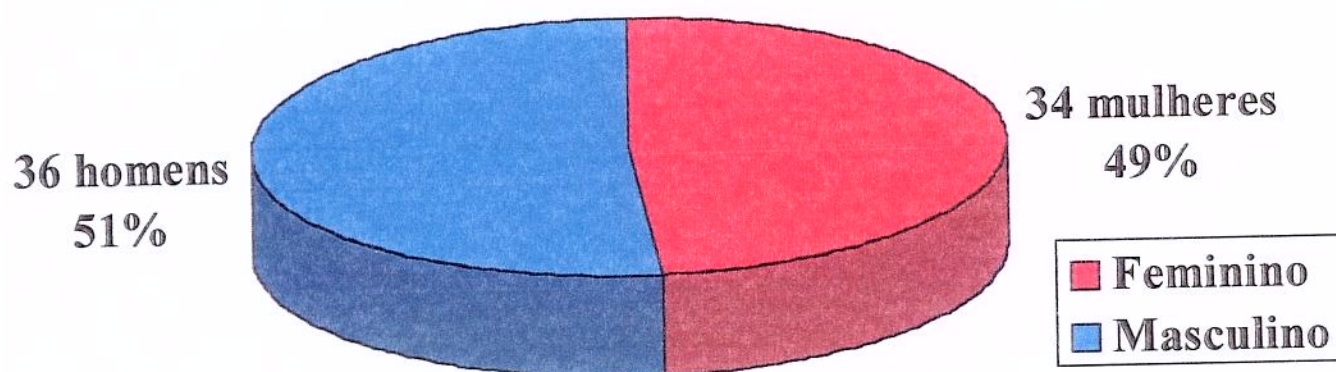


### ***3. CASUÍSTICA E MÉTODOS***

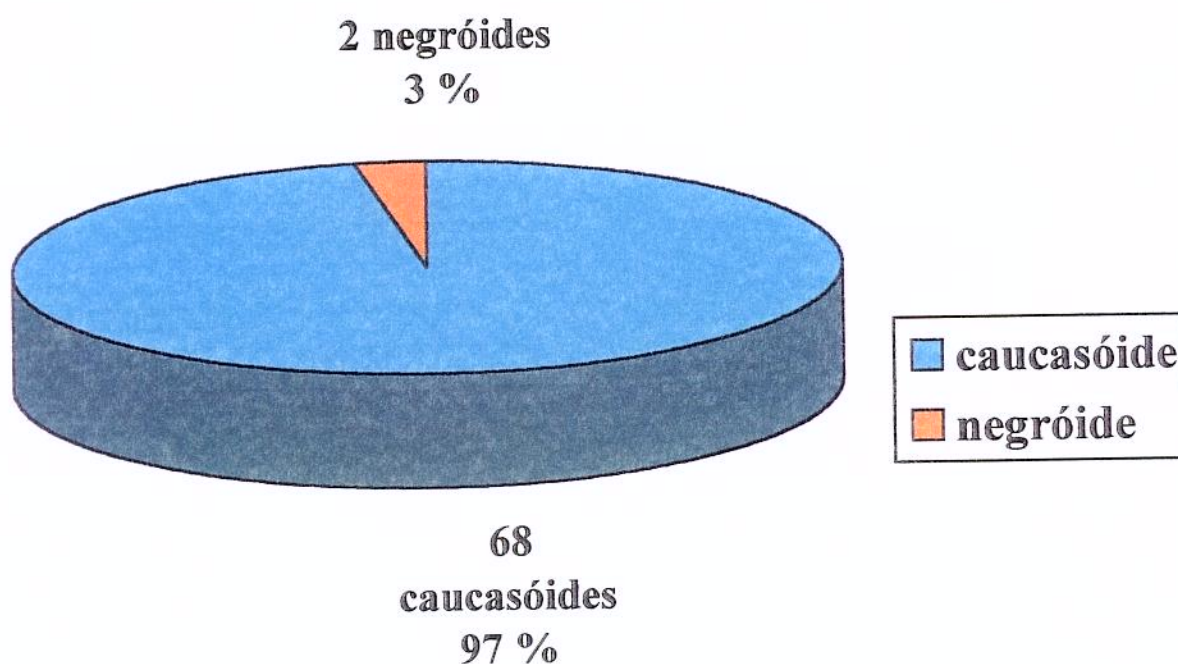
Foram analisados 70 pacientes fibrocísticos em seguimento no Ambulatório de Fibrose Cística do Departamento de Pediatria da Unicamp, coordenado pelos Drs. Antonio Fernando Ribeiro e José Dirceu Ribeiro.

Para a identificação dos pacientes fibrocísticos foram utilizados o diagnóstico clínico e laboratorial (Anexo 2). Os critérios clínicos eram o teste de suor, manifestações pulmonares e manifestações digestivas. Todos os pacientes foram previamente genotipados quanto ao gene *CFTR* pela equipe do Laboratório de Genética Molecular da Unicamp. O DNA desses pacientes foi extraído e, através da técnica de reação em cadeia da polimerase, regiões específicas foram amplificadas para que pudessem ser analisadas para as cinco mutações em questão :  $\Delta F508$ , G542X, N1303K, G551D e R553X.

O grupo de fibrocísticos estudado foi constituído por 36 homens (51%) e 34 mulheres (49%), com média de idade de 10,2 e desvio-padrão de 9,44 anos. Com relação ao grupo étnico, 97% dos pacientes eram caucasóides e 3% negróides.



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



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

Em relação à metodologia utilizada, o reconhecimento dos alelos foi efetuado pela análise molecular em uma amostra de sangue periférico.

### 3.1. EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Procedeu-se à extração de DNA conforme o método descrito por WOODHEAD et al. (1986), com algumas modificações.

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

O precipitado de leucócitos formado devido ao processo de centrifugação foi ressuspensão com o auxílio de uma pipeta Pateur em 5 ml do mesmo tampão (tampão de lise I), e nova centrifugação foi efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um “pellet” extremamente limpo. Uma vez obtido o “pellet” limpo, este foi ressuspensão em 800 µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM) e 25 µl de SDS 20%, incubando-se a 55<sup>o</sup>C por 10 min.

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

Após o processo de extração com fenol/clorofórmio, foram realizadas mais duas lavagens com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em seguida, o DNA é precipitado da fase aquosa com a adição de 1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado e mantido em freezer, a -20<sup>o</sup>C, por uma hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente. Esta mistura de etanol absoluto e acetato de sódio é vertida de modo a possibilitar a lavagem do “pellet” com 1 ml de etanol 70%, sendo a mistura centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min à

temperatura ambiente. Após a retirada do etanol 70%, o “pellet” de DNA foi deixado à temperatura ambiente para secagem.

Uma vez seco, O DNA foi ressuspenso em água MiliQ estéril, em um volume que permitiu a amostra apresentar uma concentração final de aproximadamente 100 ng/μl. Este DNA, agora em água, foi colocado em banho-maria a 37°C durante 12 horas para que pudesse entrar em solução. A seguir, o DNA dissolvido foi submetido a gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob iluminação ultravioleta.

### 3.2. AMPLIFICAÇÃO GÊNICA

A técnica de reação em cadeia de polimerase (denominada de PCR, abreviatura do nome desta técnica em inglês, “Polymerase chain reaction”) descrita por SAIKI et al. (1989), possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA através do uso de dois iniciadores (“Primers”) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido à complementaridade de bases de suas sequências. A amostra de DNA é misturada em uma solução com os iniciadores e, logo em seguida, são realizados, em um aparelho ciclador de temperatura, repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima Taq DNA polimerase, levando ao acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo.

As duas amplificações foram otimizadas para que fossem realizadas no mesmo programa de PCR. A reação foi realizada em volume de 100 μl, com a seguinte concentração de reagentes: 100 μM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 40 pmoles de cada iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Centbio-UFRGS); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> presentes no tampão específico da enzima, e 1 μg de DNA genômico.

A reação de amplificação foi realizada em aparelho ciclador de temperatura e consistiu de uma desnaturação inicial de 94°C por 7 min seguida de 1 ciclo de 95°C por 5 min; 50°C por 1 min (anelamento) e 74°C por 2 min (extensão). Seguem-se 34 ciclos de 95°C por 1 min; 50°C por 1 min e 74°C por 2 min e, por fim, 1 ciclo de 74°C por 9 min (terminalização).

### 3.3. MUTAÇÃO S

Para a identificação da mutação S a PCR foi realizada com dois “primers” (p7553 e p7702) produzindo um fragmento de 149 pares de base (pb) correspondente a uma parte do éxon III do gene da A1AT.

5'-CGTTTAGGCATGAATAACTTCCAGC- 3' p7553 (base 7553 à base 7577 do gene)

5'-GATGATATCGTGGGTGAGAACATTT- 3' p7702 (base 7678 à base 7702 do gene)

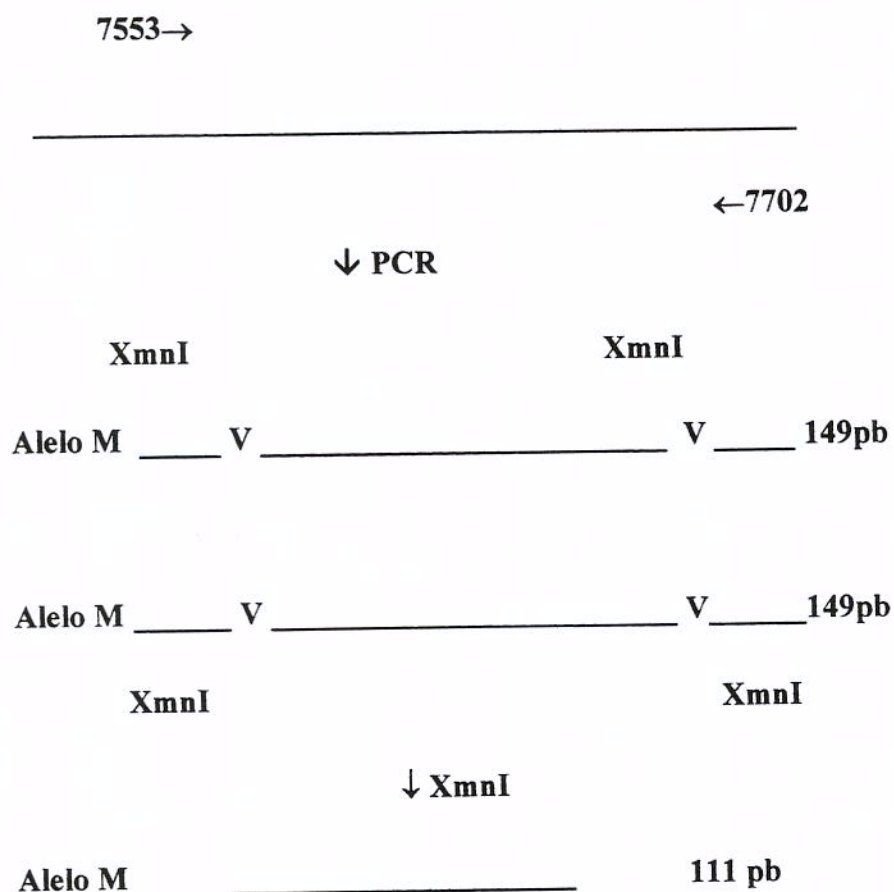
O p7702 ( antisense ) contém um dinucleotídeo AA no lugar de TT na posição 7683-7684 do gene. Essa mudança faz com que seja introduzido um sítio diagnóstico para a enzima XmnI (GAANNNTTC) somente no produto da PCR de alelos normais, mas não naqueles oriundos de alelos com mutação S pelo fato de uma timina (T) ser inserida na posição 7677.

Os alelos com a mutação S, por seu turno, têm um adenina (A) nessa posição (7677) e o sítio de restrição não é criado quando eles são copiados. A presença ou ausência do sítio de restrição permite a distinção entre o amplificado normal e o que carrega a mutação S, após clivagem com a enzima XmnI (Biolabs).

O primer p7553 ( sense ) introduz um sítio de restrição para a enzima XmnI em ambos os produtos amplificados (normal e mutante) e, assim, esse sítio funciona como controle interno para a digestão com a enzima de restrição XmnI em todos os alelos copiados.

Após a clivagem com a enzima XmnI, os alelos que carregiam a mutação S apresentarão 133 pares de base (pb) enquanto que os normais, 111 pares de base.

**A - Em alelos normais MM**



**Figura 10** - Estratégia para detecção do alelo S do gene da A1AT

## B - Em alelos mutantes SS

7553→

---

←7702

↓ PCR

XmnI

Alelo S \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 149pb

Alelo S \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 149pb

XmnI

↓ XmnI

Alelo S \_\_\_\_\_ 133pb

**C - Em heterozigotos MS**

7553→

---

←7702

↓ PCR

**XmnI**

Alelo S \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 149pb

Alelo M \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 149pb

**XmnI**

**XmnI**

↓ XmnI

Alelo S \_\_\_\_\_ 133pb

Alelo M \_\_\_\_\_ 111pb

### 3.4. MUTAÇÃO Z

Para a detecção da mutação Z a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se dois “primers” (p9966 e p10063) que produziram um fragmento de 97 pares de bases correspondente a uma parte do éxon V do gene da A1AT.

5'- ATAAGGCTGTGCTGACCATCGTC-3' p9966 (base 9966 à base 9988 do gene)

5'- TATTCCGACACGACTGGTAGCAG-3' p10063 (base 1039 à base 1063 do gene)

O primer p9966 (sense) contém uma timina ( T ) no lugar de uma adenina ( A ) na posição 9986. Essa mudança cria um sítio de restrição para a enzima TaqI (TCGA) somente nos produtos da amplificação oriundos de alelos normais que possuem uma guanina na posição 9989. Por outro lado, como a sequência mutante Z possui uma adenina no lugar dessa guanina nesse mesmo local, o sítio de restrição para a enzima TaqI (Biolabs) deixa de ser criado. A presença ou a ausência do sítio de restrição para a enzima TaqI torna possível a distinção entre os alelos normais e os alelos que carregam a mutação Z, após a clivagem enzimática.

O primer p10063 (antisense) através da troca de uma guanina ( G ) na posição 10050 a uma adenina ( A ) cria um sítio de restrição para a enzima TaqI em todos os produtos amplificados, e funciona como um controle interno para a eficiência da clivagem com a enzima de restrição em todos os alelos copiados.

Após a clivagem com a enzima TaqI os alelos que carregam a mutação Z apresentarão 86 pares de bases (pb) enquanto que os normais, 64 pares de base.

9966→

---

←10063

↓ PCR

Taq I Taq I

Alelo M \_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_ 97 pb

Alelo M \_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_ 97pb

Taq I Taq I

↓Taq I

Alelo M \_\_\_\_\_ 64 pb

### Casuística e Métodos

**B – Em alelos mutantes ZZ**

9966→

\_\_\_\_\_

←10063

↓ PCR

Taq I

Alelo Z \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 97 pb

Alelo Z \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 97pb

Taq I

↓Taq I

Alelo Z \_\_\_\_\_ 86 pb

**C - Em heterozigotos MZ**

9966→

←10063

↓PCR

Taq I

Alelo Z \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 97 pb

Alelo M \_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ 97pb

Taq I

Taq I

↓Taq I

Alelo Z \_\_\_\_\_ 86 pb

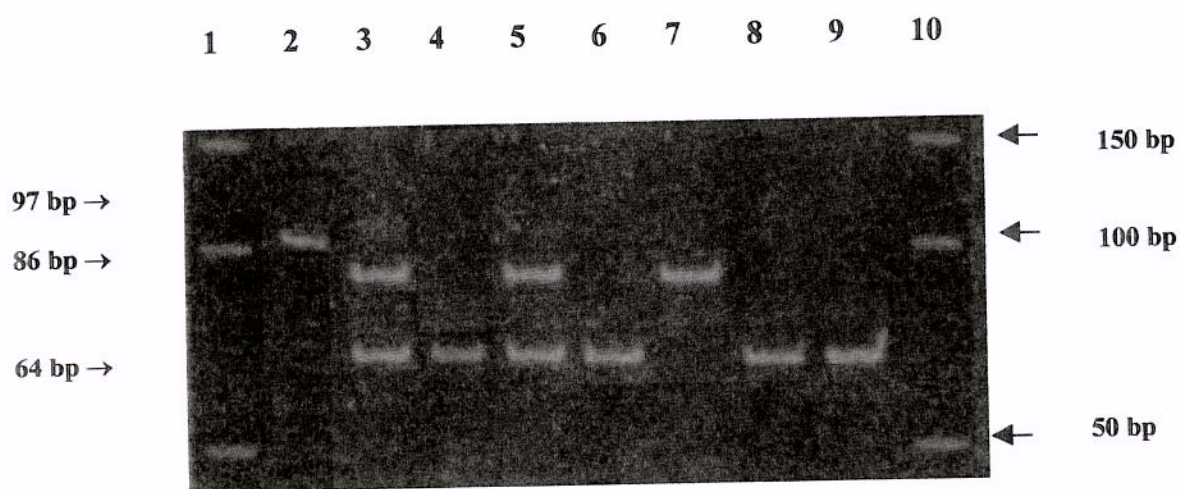
Alelo M \_\_\_\_\_ 64 pb

### 3.5.2. Digestão com enzima Taq I - mutação Z

A amostra de 15 ul do DNA amplificado para a mutação Z foi digerida durante 12 horas à 65°C em um volume total de 50 ul contendo 1 ul da enzima de restrição (TaqI), 5 ul do tampão recomendado pelo fornecedor e o volume final completado com 29 ul de H<sub>2</sub>O.

Após a digestão a amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 14%.

#### Análise do alelo Z



**Figura 13 - Gel de poliacrilamida para a mutação do alelo Z**

**Coluna 1 e 10** - leader 50 bp, **coluna 2** - controle não digerido, **coluna 3 e 5** - indivíduos heterozigotos para o alelo Z, **coluna 4, 6, 8 e 9** - indivíduos normais para a mutação Z, **coluna 7** - indivíduo homozigoto mutante (controle).



#### ***4. RESULTADOS***

Foram analisados 70 pacientes fibrocísticos; destes, sete apresentaram um alelo S (10%), um apresentou o alelo Z (1,43%), e um o alelo SZ (1,43%). Ao se comparar com a frequência da população (PAGOTTO, 1993), verificou-se não haver diferença significativa (MS  $\chi^2_{(1)} = 0,0487$ -  $0,80 < P < 0,90$ ; MZ  $\chi^2_{(1)} = 2,1228$ -  $0,10 < P < 0,20$ ; SZ  $\chi^2_{(1)} = 2,9719$ ,  $0,05 < P < 0,10$ ). Quanto ao padrão das mutações CFTR, estas foram classificadas em dois grupos: aqueles com a mutação  $\Delta F508$  (um alelo ou dois) e sem essa mutação. Essa classificação foi realizada levando-se em conta a grande diversidade de mutações e pelo fato da  $\Delta F508$  ser a mais prevalente no meio analisado (PARIZOTTO, 1996).

#### 4.1. DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS

**Tabela 1** – Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos com genótipo  $\Delta F508/\Delta F508$

| PACIENTES | NOME  | A1AT | Quadro pulmonar |
|-----------|-------|------|-----------------|
| 1         | LFA   | MM   | LEVE            |
| 2         | RSR   | MM   | LEVE            |
| 3         | LOD   | MM   | MODERADO        |
| 4         | MVG   | MM   | MODERADO        |
| 5         | VWV   | MS   | GRAVE           |
| 6         | MLA   | MM   | LEVE            |
| 7         | MAB   | MM   | GRAVE           |
| 8         | SRS   | MM   | LEVE            |
| 9         | EVSMS | MM   | LEVE            |
| 10        | VAL   | MM   | LEVE            |
| 11        | RGGJ  | MM   | MODERADO        |
| 12        | YBK   | MM   | LEVE            |
| 13        | AO    | MM   | LEVE            |
| 14        | LSM   | MZ   | LEVE            |
| 15        | SJV   | MM   | LEVE            |
| 16        | VLPC  | MM   | MODERADO        |
| 17        | LFS   | MM   | MODERADO        |

**Tabela 2** – Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos com genótipo  $\Delta F508/-$

| PACIENTES | NOME | A1AT | Quadro pulmonar |
|-----------|------|------|-----------------|
| 1         | JPD  | MM   | LEVE            |
| 2         | EVM  | MM   | MODERADO        |
| 3         | CCM  | MM   | MODERADO        |
| 4         | EHL  | MS   | LEVE            |
| 5         | JJL  | MS   | LEVE            |
| 6         | TAB  | MS   | LEVE            |
| 7         | IHB  | MM   | LEVE            |
| 8         | AVM  | MM   | MODERADO        |
| 9         | RS   | MM   | MODERADO        |
| 10        | MLS  | MS   | LEVE            |
| 11        | NJR  | MM   | LEVE            |
| 12        | ACL  | MM   | MODERADO        |
| 13        | GCB  | MM   | LEVE            |
| 14        | AGS  | MM   | GRAVE           |
| 15        | JCDB | MM   | LEVE            |
| 16        | HB   | MM   | GRAVE           |
| 17        | BS   | MM   | LEVE            |
| 18        | BLM  | MM   | LEVE            |
| 19        | DSC  | MM   | MODERADO        |
| 20        | WSP  | MM   | LEVE            |
| 21        | FSP  | MM   | LEVE            |
| 22        | BBK  | MM   | MODERADO        |
| 23        | VNF  | MM   | LEVE            |
| 24        | RAPO | MM   | LEVE            |
| 25        | LGLF | MM   | MODERADO        |
| 26        | AX   | MS   | MODERADO        |

**Tabela 3** – Distribuição dos vários genótipos para a A1AT e características do quadro pulmonar presentes nos pacientes fibrocísticos que tinham outras mutações

| PACIENTES | NOME | A1AT | Quadro pulmonar |
|-----------|------|------|-----------------|
| 1         | CPD  | MS   | LEVE            |
| 2         | PHBB | MM   | LEVE            |
| 3         | TS   | MM   | MODERADO        |
| 4         | WCM  | MM   | LEVE            |
| 5         | DFA  | MM   | LEVE            |
| 6         | RDS  | MM   | LEVE            |
| 7         | FAGP | MM   | MODERADO        |
| 8         | ASB  | MM   | GRAVE           |
| 9         | FAC  | MM   | MODERADO        |
| 10        | MDMB | MM   | LEVE            |
| 11        | FSPL | MM   | LEVE            |
| 12        | RCG  | MM   | LEVE            |
| 13        | LHP  | MM   | LEVE            |
| 14        | LSM  | MM   | LEVE            |
| 15        | JIR  | MM   | GRAVE           |
| 16        | RC   | MM   | GRAVE           |
| 17        | MDR  | MM   | LEVE            |
| 18        | EGA  | MM   | MODERADO        |
| 19        | AMPL | MM   | LEVE            |
| 20        | PCVS | MM   | GRAVE           |
| 21        | JFPP | MM   | LEVE            |
| 22        | MDS  | SZ   | GRAVE           |
| 23        | PD   | MM   | MODERADO        |
| 24        | JDS  | MM   | LEBVE           |
| 25        | RFS  | MM   | LEVE            |
| 26        | EPS  | MM   | LEVE            |
| 27        | LMS  | MM   | MODERADO        |

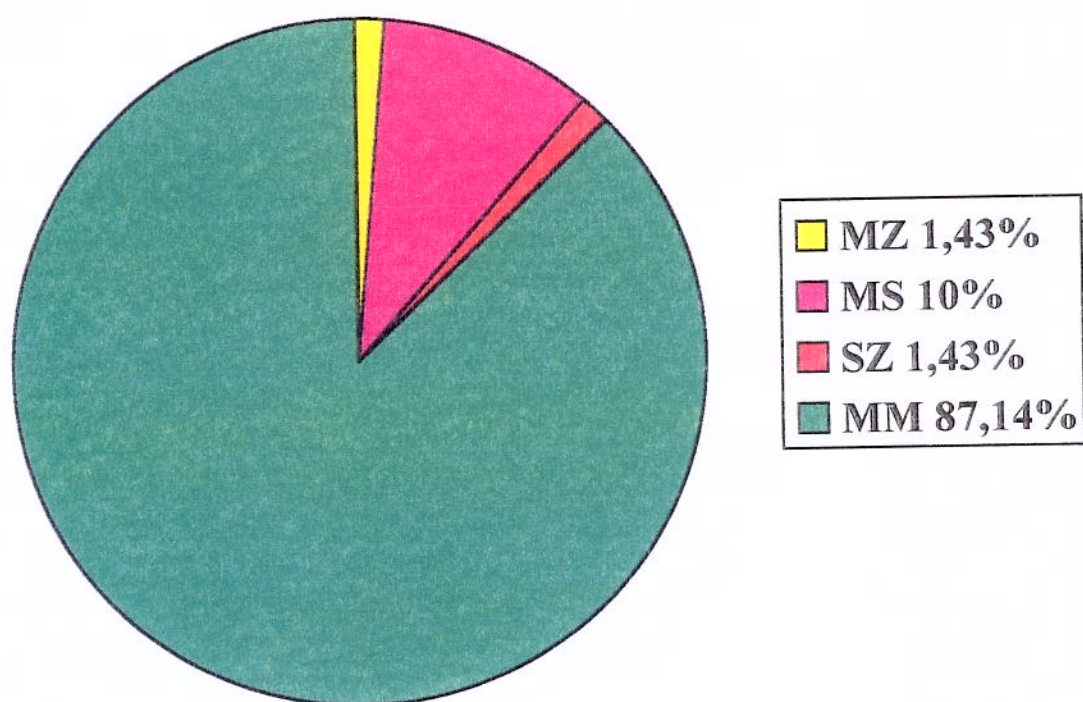
MM- SEM A PRESENÇA DOS DOIS ALELOS

MS- HETEROZIGOTO S

MZ- HETEROZIGOTO Z

ZZ- HOMOZIGOTO Z

SZ- HETEROZIGOTO S E Z



**Gráfico 3** - Representação gráfica da distribuição dos vários genótipos para A1AT presentes nos pacientes fibrocísticos

As tabelas 4 a 7 apresentam os dados sumarizados da análise estatística em conjuntos e separados dos pacientes que apresentam os vários genótipos para a A1AT e a presença da mutação  $\Delta F508$  da fibrose cística.

**Tabela 4** - Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes homozigotos para a mutação  $\Delta F508$

| Quadro pulmonar /Genótipo | MS/MZ | MM | Total |
|---------------------------|-------|----|-------|
| Leve                      | 1     | 9  | 10    |
| Moderado / Grave          | 1     | 6  | 7     |
| Total                     | 2     | 15 | 17    |

(Teste de Fisher- P = 1.0)

**Tabela 5** - Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes portadores de um alelo para a mutação  $\Delta F508$

| Quadro pulmonar /Genótipo | MS/MZ | MM | Total |
|---------------------------|-------|----|-------|
| Leve                      | 3     | 11 | 14    |
| Moderado/ Grave           | 2     | 10 | 12    |
| Total                     | 5     | 21 | 26    |

(Teste de Fisher- P = 1.0)

**Tabela 6** - Distribuição dos alelos A1AT e do quadro pulmonar em pacientes sem a mutação  $\Delta F508$

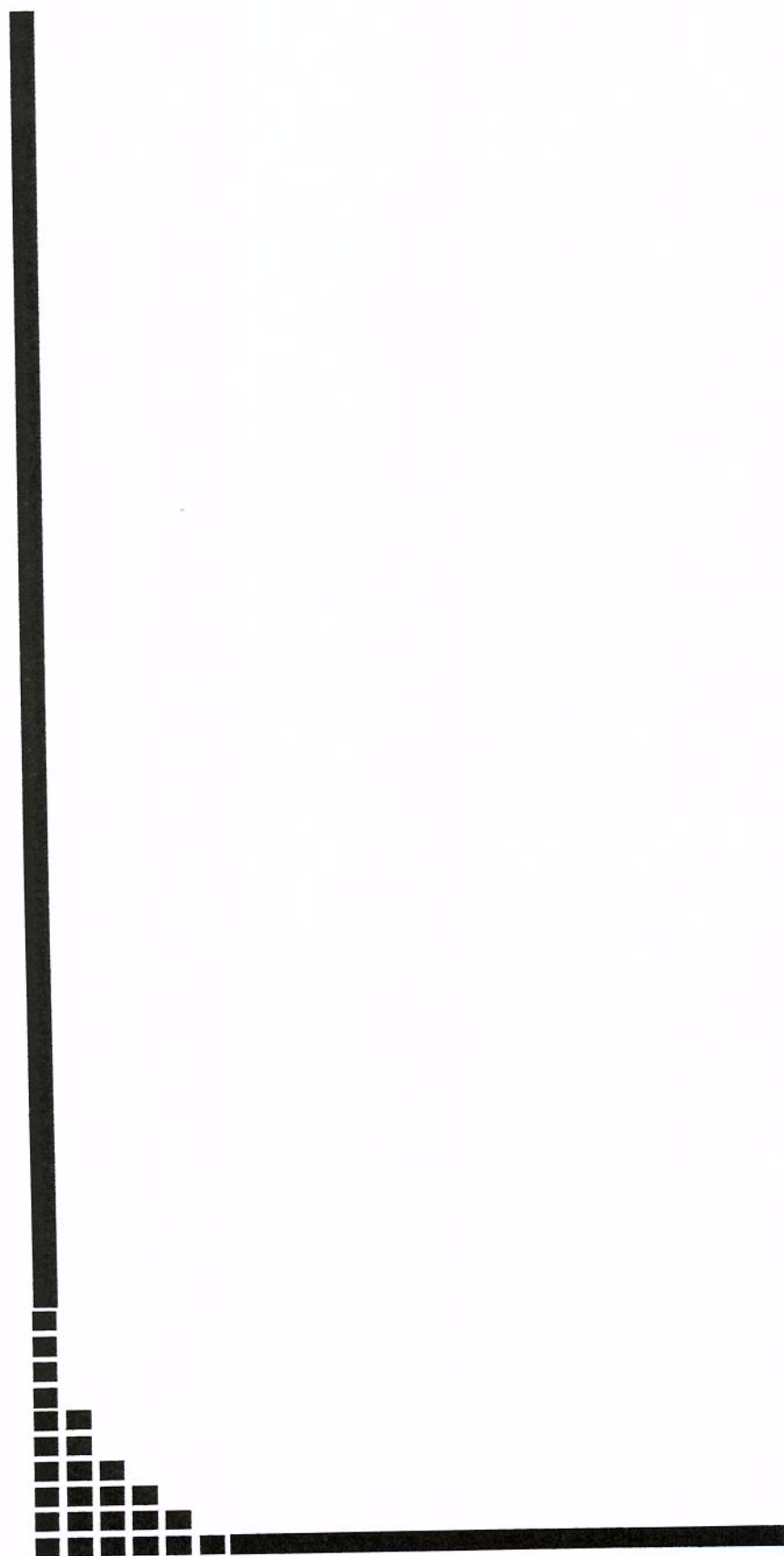
| Quadro pulmonar /Genótipo | MS/MZ/SZ | MM | Total |
|---------------------------|----------|----|-------|
| Leve                      | 1        | 15 | 16    |
| Moderado / Grave          | 1        | 10 | 11    |
| Total                     | 2        | 25 | 27    |

(Teste de Fisher-  $P = 1.0$ )

**Tabela 7** - Distribuição dos alelos e do quadro pulmonar em todos os pacientes independente da mutação CFTR

| Quadro pulmonar /Genótipo | MS/MZ | MM | Total |
|---------------------------|-------|----|-------|
| Leve                      | 5     | 35 | 40    |
| Moderado / Grave          | 4     | 26 | 30    |
| Total                     | 9     | 61 | 70    |

( $\chi^2_{(2)} = 0,92$ ,  $P = 0,632129$ )



## ***5. DISCUSSÃO***

Neste estudo, avaliaram-se crianças e adultos portadores de fibrose cística. Verificou-se haver uma grande maioria de caucasóides, o que era esperado, apesar do índice elevado de miscigenação racial no Brasil.

Para avaliar a gravidade do quadro pulmonar, utilizou-se como parâmetro o escore de Shwachman. Em estudos anteriormente realizados na Unicamp, DOMEE ESPINOZA (1998) verificou que o escore apresentava correlação estatisticamente significativa com a colonização por *Pseudomonas aeruginosa*, colonização por *Pseudomonas aeruginosa* mucosa, capacidade vital forçada, volume expiratório forçado no primeiro segundo, saturação transcutânea da hemoglobina pelo oxigênio, número de exacerbações infecciosas no último ano de acompanhamento, indicação de utilização de Dornase Alfa, indicação de programa regular de fisioterapia respiratória e indicação de oxigenioterapia domiciliar. Com isso, o escore de Shwachman seria um bom método de avaliação geral de gravidade. ALVAREZ, em 2002, ao analisar 104 pacientes fibrocísticos, do Ambulatório de Fibrose Cística da Unicamp encontrou em cerca de 60% dos pacientes um escore excelente ou bom e apenas 15,7% apresentavam escore moderado ou grave.

Com relação à evolução do quadro pulmonar da FC, é conhecido um notável desequilíbrio de proteinases-antiproteinases a favor de elastase de neutrófilos dentro dos pulmões. Essas proteinases teriam efeitos potencialmente deletérios como a destruição da elastina no pulmão, estimulação na produção de muco, clivagem de imunoglobulinas e fibronectina. (SOMMERHOFF et al. 1990; SUTER et al. 1988).

Nos casos em que há colonização bacteriana, o efeito deletério desse desequilíbrio é bem estudado. Assim, no processo infeccioso, com a lise dos neutrófilos, a elastase seria liberada no meio extracelular. Essa quantidade elevada de protease liberada poderia atacar a elastina e causar o dano pulmonar. Nos casos de pacientes que teriam simultaneamente a FC e a DA1AT, esse desequilíbrio estaria exacerbado e o dano pulmonar poderia ser maior. Com base nesses dados, estudos clínicos do uso de inibidores de elastase neutrofílica têm sido realizados e alcançado algum sucesso (ALLEN, 1996; FLOTTE, 2002).

No entanto, estudos na literatura mostraram que os genótipos MS, SS, MZ da deficiência da A1AT, os quais resultam em deficiência leve a moderada da proteína, não estavam associados com o agravamento da doença pulmonar (DORING et al. 1994). Ao contrário, postularam que a associação dessas duas alterações poderiam apresentar uma melhora significativa da função pulmonar (MAHADEVA et al. 1998). Isto porque a elastase de neutrófilos é uma poderosa enzima proteolítica capaz de lisar bactérias, como a *Pseudomonas aeruginosa* (SOMMERHOFF et al. 1990). BELAAOUAJ et al. (1998) sugerem que a elastase de neutrófilos e outras proteinases não são somente destrutivas, mas podem também apresentar efeitos benéficos e que eles são importantes para lisar bactérias e podem baixar a regulação na inflamação, pela inibição na ativação de neutrófilos, pela clivagem de imunoglobulinas, receptores de neutrófilos e complemento, e pela indução de apoptose (DORING et al. 1994). Contudo, parece que o resultado final da ação da elastase no epitélio pulmonar depende do balanço dos efeitos positivos e negativos da elastase. E mais, no caso dos deficientes da Alfa 1 antitripsina, esse efeito iria depender da variação da atividade enzimática.

Além disso, cabe lembrar, que a gravidade do quadro pulmonar teria outras variáveis como os fatores ambientais: idade, estado pancreático, estado nutricional (MAHADEVA e LOMAS, 2000) e fatores genéticos como: variações de DNA em íntrons, genes não identificados fora do locus da FC, uma segunda mutação no mesmo alelo que atenua o efeito da mutação principal. (KEREM e KEREM, 1996; DORK et al. 1991; BIENVENU, 1997).

Vê-se, portanto, que a manifestação pulmonar teria características multifatoriais.

Neste estudo, não se encontrou diferença significativa quanto à gravidade do quadro pulmonar e à distribuição de alelos deficientes da alfa 1 antitripsina, não havendo um acúmulo de deficientes de A1AT em pacientes com quadro leve ou moderado/grave. Quando separaram-se os pacientes pela presença de dois alelos, um alelo e nenhum alelo da mutação  $\Delta F508$  e comparou-se com o quadro pulmonar, não se encontrou nenhuma diferença estatística, o que comprova não haver uma relação entre a presença da mutação  $\Delta F508$ , a deficiência da Alfa 1 antitripsina e o quadro pulmonar.

É importante salientar que detectou-se apenas um paciente com o genótipo SZ, em que haveria uma deficiência enzimática moderada; os demais foram todos heterozigotos ou para o alelo S ou para o alelo Z. Portanto, como a frequência dos homozigotos mutantes S e Z e do heterozigoto composto SZ foi baixa na população de portadores da fibrose cística, concluiu-se que a deficiência da alfa 1 antitripsina não desempenhou nos pacientes estudados um papel importante na manifestação pulmonar da fibrose cística nesta casuística. É claro que nada se pode afirmar com relação aos genótipo SS, ZZ ou SZ, uma vez que estes não foram encontrados no grupo estudado.



## **6. CONCLUSÃO**

- A prevalência dos alelos S e Z da deficiência da alfa 1 antitripsina entre os pacientes com fibrose cística foi semelhante a da população do estado de São Paulo.
- A distribuição dos pacientes portadores de alelos S e Z foi similar entre as várias formas de gravidade do quadro pulmonar.
- A distribuição dos portadores dos alelos S e Z não diferiu entre os fibrocísticos que possuíam um, dois ou nenhum alelo com a mutação  $\Delta F508$ .
- A DA1AT leve parece não ter um papel importante no desenvolvimento do quadro pulmonar da fibrose cística nesta casuística.



## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ALLEN, E. D. • Opportunities for the use of aerosolized alpha1 antitrypsin for the treatment of cystic fibrosis. **Chest**, 110: 256S-260S, 1996.

ALVAREZ, A. E. **Análise clínica e laboratorial de 104 pacientes, com fibrose cística, do ambulatório de pediatria da Universidade Estadual de Campinas, na última década do século XX, e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença.** Campinas. 2002. (Dissertação – Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

ANDERSEN, D.H. • Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child**, 56:341-99, 1938.

ANDERSON, D. H. ; HODGES, R.G. • Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. **Am J Dis Child**, 72:62, 1946.

ANDERSON, M. P; SHEPPARD, D.N; BERGER, H.A. • Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. **Am J Physiol**, 263: L1-L14, 1992.

BEAR, C.E; LI, C; KARTNER, N; BRIDGES, R.J; JENSEN, T.J; RAMJEESINGH, M.& RIORDAN, J.R. • Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). **Cell**, 68: 809, 1992.

BELAAOUAJ, A; MCCARTHY, R; BAUMANN, M. • Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defence against gram negative bacterial sepsis. **Nature Med**, 4: 615-8, 1998.

BIENVENU, T. • Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la muviscidose. **Ann Biol Clin**, 55: 113-21, 1997.

BILLINGSLEY, G. D; WALTER, M. A; HAMMOND, G. L; COX, D. W. • Physical mapping of four serpin genes: alpha-1-antitrypsin, alpha-1-antiquimotrypsin, corticosteroid binding globulin and protein C inhibitor, within a 280 kb region on chromosome 14q 32.1. **Am J Hum Genet**, 52:343, 1993.

- BOUCHER, R.C; STUTTS, M.J; KNOWLES, M.R. • Na<sup>+</sup> transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. **J Clin Invest**, 78:1245-52, 1986.
- BOYER, PH. • Low birth weight in fibrocystic disease of the pancreas. **Pediatrics**, 16: 778, 1955.
- BRANTLY, M; NUKIWA, T; CRYSTAL, R. G. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. **Am J Med**, 84:13, 1988.
- BRANTLY, M; WITTES, JT; VOGELMEIER ,CF; HUBBARD, RC; FELS, GA; CRYSTAL,RG. • Use of a highly purified alpha 1 antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha1 antitrypsin phenotypes. **Chest** , 100: 703-8, 1991.
- BUIST, AS; VOLLMER, WM. Smoking and other risk factors. 2th. **Textbook of respiratory medicine**. Philadelphia : WB Saunders, 1994. p. 1259-87.
- CARLSON, J. A; ROGERS, R. B; SIFERS, R. • Accumulation of PI Z Antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. **J Clin Invest**, 83: 1183-90, 1989.
- CARRELL, R.W. • Alpha-1-antitrysin: molecular pathology, leukocytes and tissue damage. **J Clin Invest**,. 78:1427-31, 1986.
- CARRELL, R.W; STEIN, P.E; FERMINI, G. • Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin. **Structure**, 2:257-70, 1994.
- CARRELL, R.W; LOMAS, D.A; SIDHAR, S; FOREMAN, R. • Alpha1 antitrypsin deficiency. **Chest** , 110: 243S-247S, 1996.
- CHILLON, M, NUNES,V; CASALS,T ; GIMENEZ,FJ ;FERNANDEZ,E; BENITEZ,J; ESTIVILL,X. • Identification of a new missense mutation (P2055) in the CFTR gene associated with a mild cystic fibrosis phenotype. **Hum Mol Genet**, 10 : 1741-1742, 1993.

- CHOMEL, JC; HALIASSOS,A; TESSON,L; KAPLAN,JC; KITZIS,A . • Frequency of the major CF mutation in French CF patients. **Hum Genet**, 85: 397, 1990.
- COHEN, J.R; SARFATI, I; RATNER L; TILSON, D. • Alpha-1-antitrypsin phenotypes in patients with abdominal aortic aneurysms. **J Sur Res**, 49: 319, 1990.
- COX, D. W; WOO, S. L; MANSFIELD, T. • DNA restriction fragments associated with alpha-1-antitrypsin indicate a single origin of deficiency allele PI Z. **Nature**, 316: 79, 1985.
- COX, D. W- Alpha-1-antitrypsin deficiency. In: SCRIVER, C. R; BEAUDET, A L; SLY, W. S; VALLE, D (eds). **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. New York : 7<sup>th</sup> Mc Graw-Hill Book Co, 1994. pp 4125-4158.
- CRYSTAL, R. G; FERRANS, V. J; BASSET, F. **Biologic basis of pulmonary fibrosis**. New York : The lung: Scientific foundations, first edition Raven Press, 1991.pp 2031-46.
- DAVIS, PB; DRUMM, M; KONSTAN, M.W. • Cystic Fibrosis. **Am J Crit Care Med**, 154 :1229-1256, 1996.
- DEMKO, C.A; BYARD, P. J& DAVIS, P. B. • Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas Aeruginosa infection. **J Clin Epidemiol**, 48 :1041-1049, 1995.
- DI SANT'AGNESE, P..A; DARLING, R. C; PERRERA, G..A. & SHEA, E. • Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. **Pediatrics**, 12 :549, 1953.
- DOMEE ESPINOZA, M.D.P.S. **Fibrose cística em jovens e adultos do hospital das clínicas da UNICAMP**. Campinas. 1998. (Dissertação - Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- DORING, G; KROGH-JOHANSEN, H; WEIDINGER, S. • Allotypes of alpha1 antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. **Pediatr Pulmon**, 18:3- 7, 1994.

- DORK, T; WULBRAND, U; RICHTER, T. • Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Hum Genet**, 87: 441- 446, 1991.
- ELLIOTT, P.R; LOMAS, D.A; CARRELL, R.W; ABRAHAMS, J.P. • Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha1 antitrypsin. **Nature Struct Biol**, 3: 676-681, 1996.
- ESTIVILL X. • Complexity in a monogenic disease. **Nature Genetics**, 12:348-350, 1996.
- European Working Group. **Hum Gent**, 85: 391-454, 1990.
- FABBRETTI, G.; SERGI, C.; GONSALES, G., FAA G.; BRISIGOTTI, M.; ROMEO, G. & CALLEA, F. • Genetic variants of alpha-1-antitrypsin. **Liver**, 12:296-301, 1992.
- FAGERHOL, M. K; COX, D. W. The PI Polimorphism : genetic, biochemical and clinical aspects of human alpha-1-antitrypsin. **Hum Genet**. New York : Plenum, 1981, p. 1, Vol. 11.
- FANCONI, G; UEHLINGER, E; KNAUER, C. • Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronkiktasen. **Wien Med Wochenschr**, 86: 753-6, 1936.
- FARBER, S. • Some organic digestive disturbance in early life. **J Micr State Med Soc**, 44 :587-94, 1945.
- FLOTTE, T.R. • Recombinant Adeno-Associated virus gene therapy for cystic fibrosis and alpha1 antitrypsin deficiency. **Chest**, 121: 98-102, 2002.
- FRIZZELL, R.A. • Functions of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein. **Am J Respir Crit Care Med**, 151: 54-58 , 1995.
- GILLJAM, M; ANTONIOU, M; SHIN, J; DUPUIS, A; COREY, M; TULLIS D.E. • Pregnancy in cystic fibrosis. Fetal and maternal outcome. **Chest**, 118(1): 85-91, 2000.

- JEPSSON, J. O; LAURELL, C. B; FAGERHOL, M. K. • Properties of isolated Alpha-1-antitrypsin of PI types M, S and Z. **Eur J Biochem**, 83:143, 1978.
- JONES, D. K; GODDEN, D; CAVANAGH, P. • Alpha-1-antitrypsin deficiency presenting as bronchiectasis. **Br J Dis Chest**, 79:301-4, 1985.
- JUNGEND, R. M. **Alfa-1-antitripsina- uma visão geral, aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos**. Curitiba. 1980. (Dissertação - Mestrado - Universidade Federal do Paraná).
- KALSHEKER, N; MORGAN, J. • The alpha1 antitrypsin gene and chronic lung disease. **Thorax**, 45:759-764, 1990.
- KEREM, B; ROMMENS, J.M; BUCHANAN, J.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M.; TSUI, L-C. • Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, 245:1073-1080, 1989.
- KEREM, E; KEREM, B. • Genotype- phenotype correlations in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, 22:387-395, 1996.
- KNOWLES, M. R; GATZY, J. & BOUCHER, R. • Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. **New Engl J Med**, 305: 1489, 1981.
- KOCH, C; LANNG, S. Other organ systems . In: HODSON, M; GUEDES, D. **Cystic Fibrosis**., London : Chapman & Hall Medical, 1995.
- KORST, R.J; MCELVANEY, N.G; CHU, C.S; ROSENFELD, M.A; MASTRANGELI, A.; HAY, J; BRODY, S.L; EISSA, N.T; DANIEL, C; JAFFE, H.A & CRYSTAL, R.G. • Gene Therapy for the Respiratory Manifestations of Cystic Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 151: S75-87, 1995.
- LAI, E.C; KAO, F.T; LAW, M. L; WOO, S. L. • Assignment of the alpha1 antitrypsin gene and a sequence related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. **Am J Hum Genet**, 35:385, 1983.

- LANDSTEINER, K. • Darmverschluss durch eingedicktes meconium; pankreatites. **Zentrabl Allg Path**, 6: 903, 1905.
- LAURELL, C.B; ERICKSSON, S. • The electrophoretic alpha1 globulin pattern of serum in alpha1 antitrypsin deficiency. **Scand J Clin Lab Invest**, 15: 132, 1963
- LAURELL, C. B; KULLANDER, S; THORELL, J. • Effect of administration of a combined strogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. **Scand J Clin Lab Invest.**, 21:337, 1968.
- LEE, J.H; BRANTLY, M. • Molecular mechanisms of alpha1 antitrypsin null alleles. **Respiratory Medicine**, 94 ( supl C ) : S7- S11, 2000.
- LOBERMANN, H; TOKUOKA, R; DIESENHOFER, J; HUBER, R. • Human alpha1 proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications : molecular model and preliminary analysis of the implications for function. **J Mol Biol**, 177: 531-556, 1984.
- LOMAS, D.A; EVANS, D.L; FINCH, J.T; CARRELL, R.W. • The mechanism of Z alpha1 antitrypsin accumulation in the liver. **Nature**, 357:605-607, 1992.
- MAHADEVA, R; LOMAS, D.A. • Alpha 1 antitrypsin deficiency cirrhosis and emphysema. **Thorax**, 53:501-505, 1998.
- MAHADEVA, R; WESTERBEEK, R. C; PERRY, D. J. • Alpha1 antitrypsin deficiency alleles, the Taq-I G→A allele and cystic fibrosis lung disease. **Eur Respir J**, 11:873-879, 1998.
- MAHADEVA, R; CHANG, W-SW; DAFFORN, T. • Heteropolymerisation of S, I and Z alpha1 antitrypsin and liver cirrhosis. **J Clin Invest**, 103: 999-1006, 1999.
- MAHADEVA, R; LOMAS, D.A. • Secondary genetic factors in cystic fibrosis lung disease. **Thorax**, 55:446, 2000.

- MAST, A . E; ENGHILD, J.J; PIZZO, S.V. • Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed, and reactive site cleaved serpins : comparison of alpha1 proteinase inhibitor, alpha1 antichymotrypsin, antithrombin III, alpha 2 antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. **Biochemistry**, 30:1723-1730, 1991.
- NUKIWA, T; BRANTLY, M; OGUSHI, F; CRYSTAL, R. G. • Characterization of the M1(ala 213) type of alpha-1-antitrypsin, a newly recognized common normal alpha-1-antitrypsin haplotype . **Biochemistry**, 26:5259, 1987.
- OGUSHI, T; HUBBARD, R. C; GERALD, T; BRANTLY, M. L; CRYSTAL, R. G. • Evaluation of the S- type of alpha-1-antitrypsin as an in vivo and in vitro inhibitor of neutrophil elastase. **Am Rev Respir Dis**, 137:364- 370, 1988.
- PAGGOTO, R. C. **Polimorfismo da Alfa-1-antitripsina humana em populações brasileiras**. Ribeirão Preto. 1993. (Dissertação - Mestrado – Universidade de São Paulo).
- PARIZOTTO, E. A . **Caracterização molecular de uma amostra de pacientes com Fibrose Cística do Estado de São Paulo**. Campinas. 1996. (Dissertação - Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).
- PERLINO, E; CORTESE, R; CILIBERTO, G. • The human alpha1 antitrypsin gene is transcribed from two difference promoters in macrophages and hepatocytes. **EMBO J**, 6:2767- 71, 1987.
- PERLMUTTER, D. H; DANIELS, J. D; ALPERS, H. • The alpha1 antitrypsin gene is expressed in a human intestinal epithelial cell line. **J Biol Chem**, 264:9845, 1989.
- PUCHELLE, E; JACQUOT, J; BECK, G. • Rheological and transport properties of airway secretions in cystic fibrosis relationships with the degree of infection and severity of the disease. **Eur J Clin Invest**, 15:389-394, 1985.
- QUINTON, P. M. • Cystic Fibrosis: a disease in electrolyte transport. **Faseb J**, 4 : 2709-17, 1990.

- QUINTON, P. M. & BIJMAN, J. • Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. **New Engl J Med**, 308:1185, 1983.
- REIS, F.J.C. & DAMACENO, N. • Fibrose Cística. **J Pediatr**, 74 (supl 1): S76-S94, 1998.
- RICH, D.P.; ANDERSON, M.P.; GREGORY, R.J.; CHENG, S.H.; PAUL, S.; JEFFERSON, D.M.; Mc CANN, J.D.; KLINGER, K.W.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. • Expression of cystic fibrosis CFTR gene. **Nature**, 347:358-363, 1990.
- RIORDAN, J.R. • Identification of the cystic fibrosis gene. **Science**, 245:1066-1073, 1989.
- ROMMENS, J.M. • Identification of the cystic fibrosis gene II. **Science**, 245:1059-1065, 1989.
- SAIKI, R. K; GILFEND, D. H; STOFFEL, S; ERLICH, H. • Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, 239:4887-491, 1989.
- SANTIS, G; OSBORNE, L; KNIGHT, R; SMITH, M; DAVISON, T; HODSON, M. • Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, 14:239, 1992.
- SCOTT, C. F; CARREL, R. W; LEWIS, J. H; COLMAN, R. W. • Alpha1 antitrypsin Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor of Xia , Kallikrein and factor XII. **J Clin Invest**, 77: 631, 1986.
- SHARP, H.L; BRIDGES, R.; KRIVIT, W. • Cirrhosis associated with alpha1 antitrypsin deficiency : A previously unrecognized inherited disorder. **J Lab Clin Med**, 73:934, 1969.
- SHWACHMAN, H. & KULCZYCKI, L.L. • Long term study of 105 patients with cystic fibrosis : studies made over a five to fourteen year period . **Am J Dis Child**, 96: 6-15, 1958.

- SEFTON, L; KELSEY, G; WOLF, J. A. • physical map of the human PI and AACT genes. **Genomics**, 7:382, 1990.
- SIFERS, R. N; FINEGOLD, M. J. F; WOO, S. L. C. • Molecular biology and genetics of Alpha-1-antitrypsin deficiency. **Seminars in Liver Disease**, 12:301-310, 1992.
- SOMMERHOFF, C.P; NADEL, J. A; BASBAUM, C.B; CAUGHEY, G.H. • Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. **J Clin Invest**, 85: 682-689, 1990.
- SOUTHERN, K.W. •  $\Delta F508$  in cystic fibrosis : willing but not able. **Arch Dis Child**, 76: 278-282, 1997.
- STEIN, P.E; CARREL, R. W. • What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease ? **Nature Struct Biol**, 2 : 96-114, 1995.
- STRATIKOS, E; GETTINS, P.G.W. • Major proteinase movement upon stable serpin proteinase complex formation . **Proc Natl Acad Sci**, 4:453-458, 1997.
- SUTER, S; SCHAAD, U.B; MORGENTHALER, J.J. • Fibronectin-cleaving activity in bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. **J Infect Dis**, 158:89-100, 1988.
- SVEGER, T; PIITULAINEN, E; ARBORELIUS, M.J. • Lung function in adolescents with alpha 1 antitrypsin deficiency. **Acta Paediatr**, 83:1170-3, 1994.
- TAKAHASHI, H; CRYSTAL, R.G. • Alpha1 antitrypsin null (isola di procida) : an alpha1 antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all alpha1 antitrypsin coding exons. **Am J Hum Genet**, 47:403, 1990.
- TEBBUTT, S.J; LAKEMAN, M.B; WHEELER, J.C.W; HILL, D.F. • Genetic variation within the ovine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Mutation Research Genomics**, 382:93-98, 1998.
- The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. **New Engl J Med**, 329: 1308-1313, 1993.

TOSI, M.F ; ZAKEM, H; BERGER, M. • Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. **J Clin Invest**, 86:300-308, 1990.

TSUI, L.-C. • The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. **Am J Respir Crit Care Med**, 151:47-53, 1995.

WOODHEAD, J. L; FALLON, R; FIGUEROA, H; LONGDALE, J; MALCOM, A . D. B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K. E. **Human genetic diseases-a practical approach**. Oxford : IRL Press Limited, 1986, pp 51-64.

ZEITLIN, PL. • Novel pharmacologic therapies for cystic fibrosis. **J Clin Invest**, 103: 447-52, 1999.

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



**8. OBRAS  
CONSULTADAS**

ALFA 1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY : memorandum from a WHO meeting. Bull. Word Health Organ., 75(5) : 397-414, 1997.

BARNES, P.J. • Molecular Genetics of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, 54:45-252, 1999.

BOAT TF, WELSH MJ, BEAUDET AL, WALLE D (eds). **The metabolic basis of inherited disease**. 6th edn. Mc Graw-Hill, New York, 2649-2680, 1989.

CAMPBELL, PW; PARKER, RA; ROBERTS, BT; KRISHNAMANI, MR ; PHILLIPS, JÁ. • Association of poor clinical status and heavy exposure to tobacco smoke in patients with cystic fibrosis who are homozygous for the F508 deletion. **J Pediatr**, 120:261-264, 1992.

CARRELL, R. W; AULAK, H.S; OWEN, M. C. • Molecular pathology of the serpins. **Mol Biol Med**, 6: 35- 42, 1988.

DAHL, M; NORDESTGAARD, B. G; LANGE, P; VESTBO, J; HANSEN, A . T. • Molecular Diagnosis of Intermediate and Severe alpha 1 antitrypsin Deficiency : MZ Individuals with Chronic Obstructive Pulmonary Disease May Have Lower Lung Function than MM individuals. **Clinical Chemistry**, 47 :56-62, 2001.

DAVIDSON, D.J; PORTEOUS, D.J. • The Genetics of cystic fibrosis lung disease. **Thorax**, 53: 389-397, 1998.

DOULL, I.J. • Recent advances in cystic fibrosis. **Arch Dis Child**, 85 :62-66, 2001.

FAGERHOL, M. K; LAURELL, C. B. • The polymorphism of prealbumins and alpha1 antitrypsin in human sera. **Clin Chim Acta**, 16:199, 1967.

HAMOSH, A. • Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, 329 :1308-1312, 1993.

HENRY, R.L; MELLIS, C.M; PETROVIC, L. • Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol**, 12:158-161, 1992.

LOMAS, D.A . Loop-sheet polymerization : the mechanism of alfa1 antitrypsin deficiency. **Respiratory Medicine**, 94 ( supl C ) : S3-S6, 2000.

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

MAHADEVA, R; STEWART,S; BILTON, D; LOMAS, D. A . • Alpha1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. **Thorax**, 53:1022-1024, 1998.

MAHADEVA, R; WEBB, K; WESTERBEEK, RC. • Clinical Outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis : cross sectional study. **BMJ**, 316:1771-1775, 1998.

MARÓSTICA, P.J.C. **Avaliação pneumológica de pacientes portadores de Fibrose cística : sua relação com grupos genéticos**. Porto Alegre. 1995.(Dissertação – Mestrado– Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

PIER,G.B. • Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Proc Natl Acad Sci**, 97: 8822-28, 2000.

PRIMHAK, R.A; TANNER, M.S. • Alpha1 antitrypsin deficiency. **Arch Dis Child**, 85: 2-5, 2001.



## ***9. ANEXOS***

## ESCORE DE SHWACHMAN

| Pontuação | ATIVIDADE GERAL                                                                                                                                                                                                                                                                                            | EXAME FÍSICO                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 25        | Atividade plena; tolerância ao exercício normal; boa disposição; desenvolvimento motor normal; frequência escolar normal                                                                                                                                                                                   | S/ tosse; FC e FR normais; s/ evidências de enfisema; pulmões limpos à ausculta; boa postura; s/ baqueteamento                                                                                                                                                                        |
| 20        | Leve limitação a atividade intensa, cansa ao final do dia ou após exercício prolongado; menos energético; limite inferior do desenvolvimento motor normal; ocasionalmente irritado ou apático; boa frequência escolar                                                                                      | Tosse seca ocasional; FC e FR normais no repouso; enfisema leve; MV rude, roncoss e TE prolongado ocasionais; boa postura; baqueteamento leve                                                                                                                                         |
| 15        | Descansa voluntariamente; cansa após exercício; moderadamente inativo; leve retardo motor; falta espontaneidade; passivo ou irritável; frequência escolar regular                                                                                                                                          | Tosse leve e crônica matinal após exercício/choro e ocasionalmente durante o dia; s/tosse noturna; FC e FR levemente ↑; ↑ diâmetro AP e diafragma rebaixado; MV rude, creptantes, roncoss/sibilos; baqueteamento 1/2                                                                  |
| 10        | Atividade física e tolerância ao exercício limitadas; dispnéico após exercícios; retardo motor moderado; agitado ou irritado; preguiçoso ou abatido; frequência escolar baixa; pode requerer professor particular                                                                                          | Tosse crônica, frequente, repetitiva, produtiva, raramente paroxística; FC e FR ↑ moderado; enfisema moderado a grave, frequentemente c/ deformidade ao RX; creptantes, roncoss e sibilos usualmente presentes e disseminados, baqueteamento 2/3                                      |
| 05        | Limitação grave da atividade; dispnéia e ortopnéia; inativo ou confinado a cama/cadeira; marcado retardo motor; apático ou irritado; não pode assistir às aulas                                                                                                                                            | Tosse severa paroxística, frequente, produtiva, frequentemente c/ vômitos e hemoptise; tosse noturna; taquipnéia e taquicardia; enfisema grave; creptantes, roncoss e sibilos generalizados; expiração audível; má postura; 3/4 baqueteamento; cianose freq                           |
| Pontuação | NUTRIÇÃO                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | ACHADOS RADIOLOGICOS                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 25        | Peso e altura acima do %25 ou compatível c/ padrão familiar; tônus e massa muscular normais; gordura subcutânea normal; maturação sexual normal; fezes quase normais; bom apetite                                                                                                                          | S/ evidências de enfisema; s/ aumento na trama broncovascular; s/ infiltrações ou atelectasias                                                                                                                                                                                        |
| 20        | Peso e altura acima do %10 ou levemente abaixo do padrão familiar; tônus e massa muscular bons; tecido subcutâneo levemente diminuído; maturação sexual levemente retardada; apetite normal e fezes + frequentemente e leve alteração                                                                      | Evidências mínima de enfisema; Leve aumento da trama broncovascular; s/ infiltrados ou atelectasias                                                                                                                                                                                   |
| 15        | Peso e altura acima do %3 ou moderadamente abaixo do padrão familiar; peso usualmente deficitante para altura; tônus e massa muscular regulares; gordura subcutânea deficiente, abdome levemente distendido; maturação sexual retardada; apetite regular; fezes volumosas, mau cheiro, flutuantes formadas | Enfisema moderado; diâmetro AP aumentado; campos pulmonares mais radiolucentes, diafragma moderadamente rebaixado; trama broncovascular aumentada; atelectasias localizadas ou irregulares; infiltrado ocasional transitório                                                          |
| 10        | Peso e altura acima do %3 e deficiente para altura; tônus e massa muscular pobres; deficiência marcada de gordura subcutânea; distensão abdominal moderada; maturação sexual insuficiente, sem estirão; mau apetite; fezes pouco formadas, volumosas, mau cheiro, gordurosas                               | Enfisema marcado; aumento do diâmetro AP marcado; marcado rebaixamento do diafragma; silhueta cardíaca estreita; áreas de atelectasias disseminadas; atelectasias segmentares ou lobares ocasionais; focos persistentes de infiltrações; cistos localizados; aumento marcado da trama |
| 05        | Mal-nutrido e baixo; músculos fracos, flácidos e pequenos; s/ gordura subcutânea; perda de peso frequente; fezes frequentes, volumosas, mau cheiro e gordurosas; prolapso retal frequente                                                                                                                  | Alterações extensivas; hiperinsuflação grave; infiltrado e atelectasias disseminadas; formação disseminada de cistos; formação de bronquiectasias e abscessos; atelectasias lobares persistentes                                                                                      |

Os critérios que são utilizados para o diagnóstico da fibrose cística são :

- 1- Presença de dois alelos mutados no gene da FC
  - 2- Duas dosagens de sódio e cloro com valores acima de 60mEq/L
- Ou os critérios clínicos da :
- 3- Presença de insuficiência pancreática
  - 4- Presença de doença pulmonar crônica



## Universidade Estadual de Campinas Departamento de Genética Médica

### FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: Análise dos alelos S e Z da alfa1 antitripsina em uma amostra de pacientes fibrocísticos

#### OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo indivíduos com fibrose cística. O objetivo geral do estudo é o de procurar deficientes para a enzima alfa 1 antitripsina entre os pacientes com fibrose cística, uma vez que essa deficiência, a da alfa 1 antitripsina, poderia estar contribuindo para o agravamento do quadro pulmonar da fibrose cística. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

#### PROCEDIMENTO:

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

#### RISCO E DESCONFORTO:

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

#### VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta deficiência. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Em todos os indivíduos que forem detectadas alterações gênicas, será oferecida toda a orientação genética. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 788-8909 (Profa.Dra.Carmen).

#### SIGILO:

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

**FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

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

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

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

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

---

Nome e RG participante

---

Assinatura do participante

---

Data

**RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

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

---

Nome e RG do pesquisador

---

Assinatura do pesquisador

---

Data



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
☒ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas-S.P.  
☎ 0\_\_19 7888936  
fax 0\_\_19 7888925  
✉ [cep@head.fcm.unicamp.br](mailto:cep@head.fcm.unicamp.br)

PARECER PROJETO: Nº 50/2000

## I- IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: ASSOCIAÇÃO ENTRE A DEFICIÊNCIA DE ALFA 1 ANTITRIPSINA E A FIBROSE CÍSTICA  
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo  
INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica / FCM/UNICAMP  
APRESENTAÇÃO AO CEP : 9-3-2000

## II- OBJETIVOS

Determinar através de técnica de análise de DNA, a prevalência dos alelos S e Z do gene da alfa 1 antitripsina em pacientes portadores de fibrose cística, bem como correlacionar com o quadro pulmonar. Uma vez que essa associação poderia agravar o quadro pulmonar e piorar o prognóstico.

## III- SUMÁRIO DO PROJETO

Serão averiguados 80 pacientes fibrocísticos em seguimento no Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria/UNICAMP. O reconhecimento os alelos será feita pela análise do DNA, extraído de uma amostra de sangue periférico.

## IV- COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A metodologia é adequada e bem elaborada, assim como as condições de realização do estudo. O projeto apresenta boa estrutura de protocolo e tem justificativa adequada. O

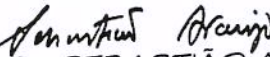
estudo segue os princípios éticos e apresenta o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado.

#### V- PARECER CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membro-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

#### VI- HOMOLOGAÇÃO

A ser homologado na III Reunião Ordinária em 11 de abril de 2.000.

  
Prof. Dr. SEBASTIÃO ARAÚJO  
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

