

C2
R-740

/

CYNTIA ARIVABENI DE ARAUJO CORREIA COUTINHO

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas Área de concentração Ciências Biomédicas do (a) aluno(a) **Cyntia Arivabeni de Araujo Correia Coutinho.**

Campinas, 27 de fevereiro de 2009.

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

Estudo dos genes *TNF α* , *ADIPOQ* e *STATH* entre portadores de Fibrose Cística.

CAMPINAS 2009.

CYNTIA ARIVABENI DE ARAUJO CORREIA COUTINHO

**Estudo dos genes *TNF α* , *ADIPOQ* e *STATH*
entre portadores de Fibrose Cística.**

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

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

CAMPINAS 2009.

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

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

C837e	Coutinho, Cyntia Arivabeni Araújo Correia Estudo dos genes TNFα, ADIPOQ e STATH entre portadores de fibrose cística / Cyntia Arivabeni Araújo Correia Coutinho. Campinas, SP : [s.n.], 2009. Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Fibrose cística . I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

**Título em inglês : Modifiers genes: TNF α , ADIPOQ e STATH in cystic
fibrosis patients from Campinas**

Keywords: • Cystic fibrosis

Titulação: Doutor em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Kelly Malavazi Piza
Profa. Dra. Silvana Francisco Boldrin
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Data da defesa: 27-02-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Cyntia Arivabeni de Araujo Correia Coutinho

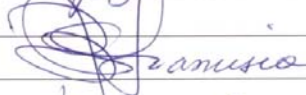
Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Kelly Cristina Malavazi-Piza



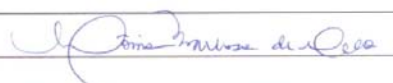
Professor (a) Doutor (a) Silvana Boldrini Francisco



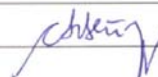
Professor (a) Doutor (a) Vera Lucia Gil Da Silva Lopes



Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo



Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Bertuzzo



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

Data: 27/02/2009

*Á minha mãe Neusa pelo amor e exemplo de vida
que transmite, e aos meus irmãos, Christiano e
Vanter por toda a torcida.*

*Ao meu marido Jean por todo apoio,
compreensão, amor e carinho, que me
incentivaram na realização desse
trabalho.*

Agradecimentos

Á Deus que tem me sustentado e amparado em todo o tempo.

Ao meu marido Jean por todo seu carinho, apoio incondicional, compreensão, pelas noites em que ficou ao meu lado enquanto eu escrevia a tese e pelas tantas outras que ficou comigo no lab, pelas comidas que fez enquanto eu fazia a tese, pela paciência, incentivo... "God only knows"...

À minha mãe, pelo apoio, carinho, incentivo, por toda ajuda para a realização desse trabalho, por todo apoio para chegar até aqui!

Aos meus irmãos e à minha família por toda a torcida, apoio e carinho. Aos meus sobrinhos, Carol e Miguel pelos bons momentos de brincadeiras.

À Carmen que sempre foi mais do que uma orientadora, pela confiança e apoio ao longo desses anos.

Aos membros da banca pela disponibilidade de seu tempo.

À Lu mais do que amiga, minha madrinha de casório, por todo o convívio, carinho, apoio, inúmeras correções, incentivo para fazer mais um PCR, broncas, paciência, conversas e devaneios sobre nossas escolhas na vida, pelas jogatins sempre tão divertidas...

À Lilica, Estelinha, Dani e Lidy pelos almoços sempre tumultuados de assuntos para todas falarem ao mesmo tempo, pelos passeios, pelas dicas de reforma e decoração, por todas as risadas, pelo apoio e paciência.

Ao Marcelo, Nailú, Ilária, Bibiana por todas as vezes que "roubei" seus horários nas máquinas de PCR, por todos os géis e PCR que me fizeram, pela enorme paciência que tiveram comigo nesses últimos momentos e pela descontração.

Ao Fernando e à Aline por me ajudarem nas pesquisas de prontuário.

Ao Secolin por toda a orientação estatística via e-mail!

Ao Dr. Dirceu pela ajuda na elaboração do protocolo de avaliação, à Maria Ângela pelas provas de função, às meninas da fisio e a Dra. Tsukiyo pelos dados, ao Julio pelas coletas de sangue e a todos do ambulatório de FC pelo aprendizado.

A todos do lab que nem vou tentar listar porque com certeza esqueceria de alguém importante, pela convivência, paciência, apoio...

À Capes pelo apoio financeiro.

*"...lançando sobre Ele toda a vossa ansiedade, porque Ele tem cuidado de vós."
I Pedro 5: 7*

Sumário

Sumário	10
Lista de Abreviaturas	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Figuras	21
Lista de Gráficos	24
Resumo	25
Abstract	27
1. Introdução	29
1.1. Epidemiologia	30
1.2. Características Clínicas da FC	30
1.3. Genética da Fibrose Cística	31
1.3.1. O gene <i>CFTR</i>	32
1.3.2. Estrutura e síntese da proteína CFTR	33
1.3.3 Funcionamento da proteína CFTR	34
1.3.4 Mutações no gene <i>CFTR</i>	35
1.3.5. Classes de mutação no gene <i>CFTR</i>	38
1.4. Correlação genótipo - fenótipo	41
1.5. Genes modificadores	43
1.5.1. O fator de necrose tumoral (TNF)	45
1.5.2. A adiponectina (ADIPOQ)	48
1.5.3. A estaterina (STATH)	50
2. Objetivos	52

3. Casuística e Métodos.....	54
3.1. Aspectos Éticos	55
3.2. Casuística	55
3.3. Métodos.....	55
3.3.1. PCR	57
3.3.2. Digestão enzimática	59
3.3.3. PCR ARMS	61
3.3.4. DHPLC.....	64
3.3.5. Sequenciamento	65
3.3.6. Critérios para análise fenotípica	67
3.3.7. Análise estatística.....	70
4. Resultados	71
4.1. Caracterização da amostra.....	72
4.2. Caracterização fenotípica	74
4.3. Análise do gene <i>TNFα</i>	77
4.3.1 Análise do polimorfismo –308G/A	77
4.3.2. Análise do polimorfismo –238G/A	88
4.4. DHPLC e Sequenciamento.....	99
4.4.1 <i>ADIPOQ</i>	99
4.4.2 <i>STATH</i>	103
5. Discussão.....	108
5.1. Caracterização da amostra.....	109
5.2. Análise do gene <i>TNFα</i>	110
5.2.1. Análise do polimorfismo –308G/A	110

5.2.2. Análise do polimorfismo –238G/A.....	113
5.3 <i>ADIPOQ</i>	115
5.4 <i>STATH</i>	118
6. Conclusões	120
7. Referências bibliográficas	122
8. Anexos.....	139
8.2. Anexo 2	142
8.3. Anexo 3	143
8.4. Anexo 4	148

Lista de Abreviaturas

FC	Fibrose Cística
CFTR	<i>“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator gene”</i>
CFTR	<i>“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”</i> – Proteína Reguladora da
DNA	Conductância iônica Ácido desoxirribonucléico
Kb	Quilobases
EnaC	<i>“Amiloride Sensitive Epithelial Sodium Channel”</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
NFB’s	<i>“Nucleotide-ATP-binding folds”</i>
PKA	Proteína quinase A
MSD	Domínio membranar
NBD	Domínio de ligação à ATP
ORCCs	<i>“Outwardly Rectified Chloride Channels”</i>
CBAVD	<i>“Congenital Bilateral Aplasia of Vas Deferens”</i> – agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes
TNF	Fator de necrose tumoral
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ADIPOQ	Adiponectina
STATH	Estaterina
CEP	Comitê de ética em pesquisas
mEq	Mili equivalents

PCR	<i>“Polymerase Chain Reaction”</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
DHPLC	Cromatografia líquida de alta resolução por desnaturação
Ng	Nanograma
μL	Microlitro
mM	Milimolar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
r.p.m.	Rotações por minuto
pmoles	Picomoles
qsp	Quantidade suficiente para
pb	Pares de bases
OS-DVB	Poliestireno divinil benzeno
TEAA	Acetato de trietilamônio
VEF1	Volume espiratório forçado no primeiro segundo
Kg	Kilograma
M	Metro
BSA	Soro albumina bovina
CRP	Proteína C reativa

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR.	58
Tabela 2: Descrição das temperaturas de anelamento utilizadas para as PCR dos genes <i>ADIPOQ</i> e <i>STATH</i>	59
Tabela 3: Descrição da sequencia dos iniciadores utilizados na PCR do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> e tamanho dos fragmentos resultantes.	59
Tabela 4: Descrição da sequencia dos iniciadores utilizados na PCR dos genes <i>ADIPOQ</i> e <i>STATH</i> e tamanho dos fragmentos resultantes.	60
Tabela 5: Descrição do tamanho do fragmento gerado através da digestão enzimática do fragmento que inclui o polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i>	61
Tabela 6: Descrição da sequencia dos iniciadores utilizados na PCR do polimorfismo -238G/A e controle interno de reação e tamanho dos fragmentos resultantes.	62
Tabela 7: Descrição das temperaturas de anelamento utilizadas para as reações de sequenciamento.	67
Tabela 8: Caracterização da amostra quanto ao genótipo <i>TNFα</i> , genótipo <i>CFTR</i> , os escores de Shwachman e Kanga, as classificações de gravidade segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina e VEF1.	73
Tabela 9: Descrição das idades ao diagnóstico de 48 pacientes.	74
Tabela 10: Descrição das idades de início dos sintomas pulmonares e digestivos.	75
Tabela 11: Descrição das idades em que houve a primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i>	75
Tabela 12: Classificação dos pacientes segundo o escore de Kanga.	76
Tabela 13: Classificação dos pacientes segundo o escore de Shwachman.	76

Tabela 14: Classificação dos pacientes segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina.....	76
Tabela 15: Classificação dos pacientes segundo os valores de VEF1.	77
Tabela 16: Prevalência dos genótipos do polimorfismo –308G/A do gene <i>TNFα</i> na amostra avaliada.....	77
Tabela 17: Prevalência dos alelos do polimorfismo –308G/A do gene <i>TNFα</i> na amostra avaliada.	78
Tabela 18: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.	78
Tabela 19: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.....	79
Tabela 20: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a média de idade em que o diagnóstico foi realizado apresentado em cada genótipo, na amostra avaliada.....	79
Tabela 21: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.	80
Tabela 22: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.....	80
Tabela 23: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.....	81
Tabela 24: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.	81
Tabela 25: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo a média de idade de início dos sintomas pulmonares apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.	82

Tabela 26: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo a média de idade de início dos sintomas digestivos apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada. ...	82
Tabela 27: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> e a idade em que houve a primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i> , na amostra avaliada.....	83
Tabela 28: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> e a idade em que houve a primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i> , na amostra avaliada.	83
Tabela 29: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.	84
Tabela 30: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.	84
Tabela 31: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a média dos valores de VEF1 previsto, na amostra avaliada.	85
Tabela 32: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.	85
Tabela 33: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.	86
Tabela 34: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com os pontos obtidos no escore Shwachmann, na amostra avaliada.	86
Tabela 35: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.....	87
Tabela 36: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.....	87
Tabela 37: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.....	87

Tabela 38: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.....	88
Tabela 39: Prevalência dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> na amostra avaliada.....	88
Tabela 40: Prevalência dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> na amostra avaliada.	89
Tabela 41: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.	89
Tabela 42: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.	90
Tabela 43: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a média de idade em que o diagnóstico foi realizado apresentado em cada genótipo, na amostra avaliada.....	90
Tabela 44: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.	91
Tabela 45: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.....	91
Tabela 46: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.	92
Tabela 47: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.	92
Tabela 48: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo a média de idade de início dos sintomas pulmonares apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.	93
Tabela 49: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo a média de idade de início dos sintomas digestivos apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.	93

Tabela 50: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> e a idade em que houve a primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i> em meses, na amostra avaliada.	94
Tabela 51: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> e a idade em que houve a primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i> , na amostra avaliada.	94
Tabela 52: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.	95
Tabela 53: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.	95
Tabela 54: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a média dos valores de VEF1 previsto, na amostra avaliada.	95
Tabela 55: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.	96
Tabela 56: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.	96
Tabela 57: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com os pontos obtidos no escore Shwachmann, na amostra avaliada.	97
Tabela 58: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.	97
Tabela 59: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.	98
Tabela 60: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.	98
Tabela 61: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.	98

Tabela 62: Caracterização da amostra em relação ao perfil cromatográfico obtido por meio da análise no DHPLC para o <i>exon 5</i> do gene <i>STATH</i>	106
---	-----

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do gene <i>CFTR</i> , RNA mensageiro e proteína CFTR (adaptado de www.cystic-fibrosis-symptom.com/images/cftr3.jpg).	32
Figura 2: Estrutura da proteína CFTR, onde MSD1 e MSD2 são os domínios membranares constituídos por 6 regiões transmembranas cada, NBD são os domínios de ligação à ATP, e R o domínio regulatório (adaptado de http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/CftrDomainPage.html).	34
Figura 3: Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão (Tsui e Durie, 1997).	36
Figura 4: Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ no gene <i>CFTR</i> caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no <i>exon</i> 10: $\Delta F508$ (Adaptado de Welsh e Smith, 1993).	37
Figura 5: Representação esquemática das cinco classes de mutações conhecidas como causadoras da FC, mostrando sua consequência para a formação da proteína (Adaptado de http://www.planetegene.com/view/les-differentes-classes-de-mutations-de-la-protein).	40
Figura 6: Variantes genéticas múltiplos na doença mendeliana e na doença não mendeliana. (a) Variantes genéticas múltiplos e influências ambientais interagem para causar doença, como na asma. (b) Interação do gene <i>CFTR</i> e variações genéticas não ligadas ao gene <i>CFTR</i> (ambos desfavoráveis ou benéficos), que modificam a gravidade da doença, em conjunto com fatores ambientais (adaptado de Knowles, 2006).	44
Figura 7: Diferentes configurações da adiponectina (adaptado de Garaulet et al., 2007).	49
Figura 8: Organograma de todos os procedimentos utilizados para a análise laboratorial.	56
Figura 9: Programas utilizados para realização da PCR para: a) polimorfismo -308G/A do gene <i>TNFα</i> , b) polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> , c) genes <i>ADIPOQ</i> e <i>STATH</i>	58

Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não-desnaturante para detecção do polimorfismo –308G/A do gene <i>TNFα</i> : na coluna 1, marcador de peso molecular de 50pb; coluna 2 indivíduo portador do alelo 1 (345pb); na coluna 3 indivíduo heterozigoto para o alelo 1 e 2 (325 e 345pb) e nas colunas 4 e 5, indivíduos portadores do alelo 2 em homozigose (325pb).	62
Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação da variante –238A do polimorfismo -238G/A do gene <i>TNFα</i> : coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); nas colunas 3 e 4, indivíduos com amplificação do fragmento característico do polimorfismo (209pb); nas colunas 1, 5, 6, 7, 8, 9, ausência dessa amplificação; na coluna 10, controle negativo de reação. O fragmento de 608pb corresponde ao controle interno da reação.	63
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação da variante 238G do polimorfismo –238G/A do gene <i>TNFα</i> : coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); nas colunas de 2 a 7, indivíduos com amplificação do fragmento característico do polimorfismo (447pb); na coluna 8, controle negativo de reação. O fragmento de 608pb corresponde ao controle interno da reação.	63
Figura 13: Cromatograma da análise em DHPLC de três indivíduos controle para o <i>exon</i> 1 do gene <i>ADIPOQ</i>	99
Figura 14: Cromatograma da análise em DHPLC de três pacientes para o <i>exon</i> 2 do gene <i>ADIPOQ</i> . O item (a) possui um padrão totalmente diferente dos demais. No item (a) da figura é evidenciada pela seta 1 uma maior dilatação do início da injeção, já a seta 2 demonstra um estreitamento que se sobressai próximo ao do pico de injeção. O item (c) possui um padrão homogêneo e no item (d), evidenciado pela seta vê-se uma proeminência da curva.	101
Figura 15: Eletroforese de gel de agarose 1,5%: na coluna 1 marcador de peso molecular de 100pb; na coluna 2 PCR para o <i>exon</i> 3a do gene <i>ADIPOQ</i>	102

Figura 16: Cromatograma da análise em DHPLC de um paciente para o *exon 3a* do gene *ADIPOQ*.

..... 103

Figura 17: Cromatograma da análise em *STATH* dos quatro controles selecionados para os *exon 3* e

4. O item (a) em relação ao item (b) possui uma dilatação logo após o começo da análise, evidenciada pela seta que não é encontrada no item (b). Já o item (b) possui mais reentrâncias no pico de análise do que o item (a). Na comparação entre o item (c) e (d), o item (c) possui mais reentrâncias do que o (d), evidenciado pela seta, e o item (d) possui uma das partes do pico mais baixa do que a encontrada em (c)...... 105

Figura 18: Cromatograma da análise em DHPLC do *exon 5* do gene *STATH*: pico 1, indivíduo controle normal, pico 2, indivíduo que apresenta padrão diferente do normal o que sugere presença de alteração que deve ser confirmada através do sequenciamento da região..... 107

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição etária dos pacientes portadores de FC, na amostra avaliada.	72
---	----

Resumo

A Fibrose Cística (FC) possui uma grande variabilidade de expressão fenotípica, o que significa que crianças com o mesmo genótipo podem diferir quanto à sua apresentação. A proteína defeituosa formada é chamada CFTR (proteína reguladora da condutância iônica), causa transporte anormal de sódio e cloro através da membrana apical das células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, intestino e aparelho reprodutor. Essa proteína é codificada por um único gene que recebe o mesmo nome da proteína, CFTR, e localiza-se no braço longo do cromossomo 7, região 7q3.1.

Gêmeos monozigóticos apresentam maior concordância em relação à gravidade da doença pulmonar que os dizigóticos, sugerindo que a FC seja modulada por fatores genéticos secundários – genes modificadores – além do gene *CFTR*. A característica mais importante na FC é a sobrevida que é influenciada pela doença pulmonar. Portanto, genes que estejam envolvidos na imunidade, inflamação, reparação do epitélio e produção de muco são candidatos a genes modificadores da doença.

Os objetivos foram: 1) determinar a prevalência dos polimorfismos -308G/A e -238G/A do gene *TNF α* entre portadores de FC e verificar existência de associação entre esses polimorfismos e a gravidade do quadro pulmonar, 2) identificar alterações de sequência nos *exons* e junções *exon/intron* dos genes *ADIPOQ* e *STATH* e verificar existência de associação entre possíveis variações nesses genes e a gravidade da FC.

Foi realizada PCR seguida por digestão enzimática para o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* , reação em cadeia da polimerase ARMS para o polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* , e para os genes *ADIPOQ* e *STATH* foi feita a triagem de mutações através de cromatografia líquida de alta resolução por desnaturação - DHPLC com posterior sequenciamento da região onde foi encontrada alteração.

Foram analisados 49 pacientes com FC em seguimento no Ambulatório de Mucoviscidose do HC/UNICAMP, homozigotos para a mutação $\Delta F508$ ou heterozigotos compostos para mutações de classe I ou II ou homozigotos para mutações de classe II, que são alterações que não levam à formação de proteína funcional. Além disso, foram selecionados indivíduos que apresentem alteração de eletrólitos no suor.

Para o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* os genótipos GG, AA e GA foram encontrados com as seguintes frequências: 14,28, 67,35 e 18,36% respectivamente. Estes dados se opõem ao relatado na literatura. Tal diferença deve ocorrer pelas características populacionais da população brasileira. Para o polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* , os genótipos GG e AG tiveram as seguintes frequências: 79,59 e 20,41% respectivamente. O genótipo AA não foi encontrado na amostra analisada. A alta frequência do genótipo GG comparado com o AA, concorda com a literatura. Não foi encontrada alteração na sequência dos genes *STATH* e *ADIPOQ*. Não foi possível estabelecer uma associação entre a gravidade da FC e os genes *TNF α* , *STATH* e *ADIPOQ*, nas regiões analisadas.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) has a great variety expression, which means that the seriousness of the disease can vary a lot among people who have it. The defective protein, called CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), causes abnormal transportation of chloride and sodium through the apical membrane of the epithelial cells of the airway, liver, intestine and masculine reproductive tract. This protein is encoded by a single gene which has the same name, *CFTR*, and is located within the long arm of chromosome 7, region 7q3.1.

CF is a disease which expressivity is much variable, with different degrees of damage and the age when the symptoms begins is also much variable, even within individuals of the same family, like twins. Because of it, it is been said that others genetic factors besides *CFTR*, can be modulating the clinical presentation.

As the pulmonary state is the great responsible for the mortality of the disease genes that are involved in host defense, inflammation, epithelial repair, mucin production, and airway reponsiveness are of great interest.

Base on this the objectives of this work were: determine the prevalence of the polymorphisms -308G/A e -238G/A from the *TNF α* gene and verify if there is an association between these polymorphisms pulmonary disease severity, and identify alterations on *ADIPOQ* and *STATH* genes and verify if there is an association between these polymorphisms and CF severity.

PCR followed by restriction enzyme digestion was performed to detect the polymorphism -308G/A from the *TNF α* gene, ARMS PCR to the polymorphism -238G/A from the *TNF α* gene the DHPLC method associated to the sequencing to analyze *ADIPOQ* and *STATH* genes, were used.

We performed analyses of 49 cystic fibrosis patients that are followed in a Cystic Fibrosis center from HC/UNICAMP, that are $\Delta F508$ homozygous or compound heterozygous to mutations

from class I or II, or that are homozygous to class II mutations, which are alterations that do not produce functional protein. Besides this, were selected individuals that have sweat test altered.

To the polymorphism 308G/A from *TNF α* gene the genotypes GG, AA e AG were in the following frequencies: 14,28, 67,35 e 18,36%. This data is contradictory to the literature and may occur because of the racial admixture of the Brazilian population. To the polymorphism -238G/A from *TNF α* gene, the genotypes GG AG were in the following frequencies 79,59 e 20,41%. The genotype AA was not found in the analyzed group. The high frequency of the genotype GG is in agreement of the data. It was not possible to find any alteration on *ADIPOQ* and *STATH* genes. And also it was not possible to make any correlation between the severity of the CF disease and the genes *TNF α* , *STATH* and *ADIPOQ* between the analyzed regions.

1. Introdução

1.1.Epidemiologia

A Fibrose Cística (FC) é uma das doenças genéticas mais frequentes. Sua incidência varia de acordo com o grupo étnico em que se encontra. De um modo geral, sua frequência entre os caucasóides é de 1 para cada 2.500 nascidos vivos (Tzetzis et al., 2001). É extremamente rara na Índia com uma frequência estimada de 1/43.000 a 1/100.000, tendo sido descrita pela primeira vez em 1968, (Kabra, 2007). Também é rara em populações negras, e a prevalência entre os afro-americanos é de 1/17.000 (Jorde et al., 2000), enquanto que entre os negros africanos é encontrada com uma incidência estimada em 1 em cada 12.000 nascidos vivos (Feuillet-Fieux et al., 2004).

No Brasil, a frequência da região sul assemelha-se à da população caucasiana centro-européia que é de 1:2.500. Em outras regiões, como em Minas Gerais, a incidência diminui para 1/21.000 nascidos vivos (Reis e Damaceno, 1998; Raskin et al., 1993; Raskin et al., 2007).

1.2. Características Clínicas da FC

O defeito básico acomete células de vários órgãos, sendo que nem todos os indivíduos apresentam o mesmo tipo de expressão fenotípica. As manifestações clínicas podem ser muito variáveis sendo possível acontecerem logo após o nascimento ou apenas na idade adulta. As manifestações digestivas, como baixo ganho pômdero-estatural e fezes diarréicas, geralmente ocorrem devido à insuficiência pancreática que acontece em 90% dos pacientes. A primeira manifestação é o íleo meconial que ocorre em 20% dos pacientes. Evans et al. (2001) demonstraram que pacientes com FC que tiveram íleo meconial apresentaram uma piora na prova de função pulmonar quando comparados com pacientes que não o tiveram e foram diagnosticados por triagem neonatal.

Outra característica é a infertilidade masculina, que acomete 98% dos homens, por azoospermia secundária à atresia ou ausência do vaso deferente e dilatação ou ausência da vesícula seminal (Dodge, 1995). Nas mulheres o muco cervical poder ser desidratado, e possuir características bioquímicas alteradas, agindo como um espermicida, podendo levar à infertilidade feminina, característica que acontece em 60% das pacientes (Gilljam et al., 2000; Ratjem e Dorin, 2003).

Porém, as maiores mudanças ocorrem nas vias aéreas, onde o defeito básico causa infecções pulmonares crônicas. Ocorrem em 90% dos indivíduos e se apresentam de forma progressiva e de intensidade variável (Alvarez, 2002). Esta intensidade de acometimento é que determina o prognóstico da doença sendo o envolvimento pulmonar a maior causa de morbidade e mortalidade. A fisiopatologia das infecções, sobretudo bacterianas em pacientes com FC, está relacionada à hiperviscosidade do muco, associada à provável assimetria do movimento ciliar. Devido à ineficiência na eliminação do muco, os pulmões ficam altamente suscetíveis à infecção bacteriana. O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o primeiro microrganismo a infectar os pacientes, predispondo o organismo para a infecção pela *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), que é a bactéria mais comum e coloniza a maioria dos pacientes com FC antes dos 10 anos de idade. A infecção por essa bactéria é claramente a principal causa da doença pulmonar progressiva na maioria dos indivíduos (Robinson, 2001).

1.3. Genética da Fibrose Cística

A FC é uma doença genética de padrão de herança autossômica recessiva. Portanto, para que ocorra o nascimento de uma criança com a doença é necessário que os pais sejam portadores de apenas um alelo mutado no gene responsável pela enfermidade, e consequentemente o risco de nascer um filho com ou sem a doença é de 25 e 75% respectivamente, para cada nova gestação. A

probabilidade de nascer uma criança saudável, mas que seja apenas portadora de uma mutação é de 50%.

1.3.1. O gene *CFTR*

O gene responsável pela doença foi identificado e clonado em 1989 (Kerem et al., 1989; Riordan, 1989; Rommens, 1989). Utilizando técnicas de clonagem posicional e salto cromossômico, Tsui et al. (1990) isolaram e mapearam o gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator gene*) no braço longo do cromossomo 7, região 7q3.1. Como descrito por Collins (1992), o gene possui 250Kb de DNA genômico, dividido em 27 *exons* que transcrevem um RNA mensageiro de 6,5Kb (Figura 1).

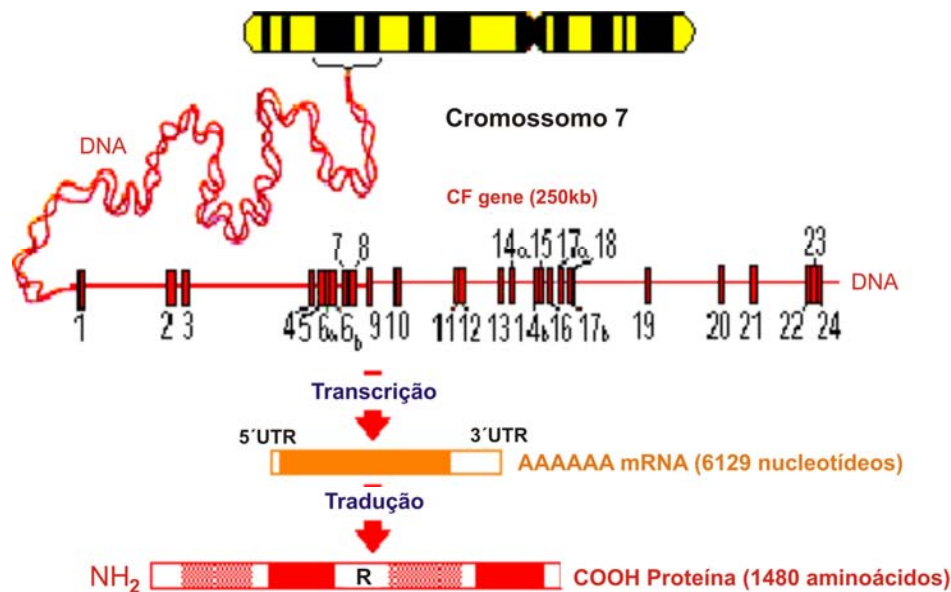


Figura 1: Estrutura do gene *CFTR*, RNA mensageiro e proteína CFTR (adaptado de www.cystic-fibrosis-symptom.com/images/cftr3.jpg).

O RNA mensageiro produzido pelo gene *CFTR* é transcrito em uma proteína transmembrana de 1480 aminoácidos, com uma massa molecular de 168.138 dáltons, da família das proteínas ATP reguladora de transporte de íons de mesmo nome do gene – CFTR (Proteína Reguladora da Condutância Iônica Transmembrana) (Devlin, 1998; Davies, 2006).

1.3.2. Estrutura e síntese da proteína CFTR

A proteína codificada pelo gene responsável pela doença, a CFTR, é expressa na superfície das células epiteliais das vias aéreas, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor, constituindo um canal de cloro, que também controla o funcionamento de outros canais membranares, como por exemplo, o ENaC (*Amiloride Sensitive Epithelial Sodium Channel*) (Anderson et al., 1991; Mcauley e Elborn, 2000).

Trata-se de uma proteína transmembrana que em sua estrutura básica é formada por três subunidades principais: uma porção hidrofóbica, outra hidrofílica e uma polar. A região hidrofóbica é formada por dois domínios membranares, constituídos por seis regiões transmembrana cada; a hidrofílica contém dois domínios que se ligam à ATP (NFB's - *nucleotide ATP binding folds*) e a polar representa um domínio regulatório (Figura 2) (Mcauley e Elborn, 2000; Rowntree e Harris, 2003).

Os domínios membranares formam o poro, ou seja, constituem o canal propriamente dito. Já os domínios de ligação a ATP, controlam a atividade do canal pela hidrólise da ATP promovida pela fosforilação do domínio R (Faria, 2007). Quando a proteína quinase A (PKA) fosforila o sítio do domínio regulatório, o canal da proteína abre. Para que esse processo ocorra, também é necessário que um dos domínios de ligação a ATP seja ativado através da hidrólise da ATP. Essa ativação permite que haja a abertura do canal de cloro para a passagem desse íon (Zielenski e Tsui, 1995; Haardt et al., 1999).

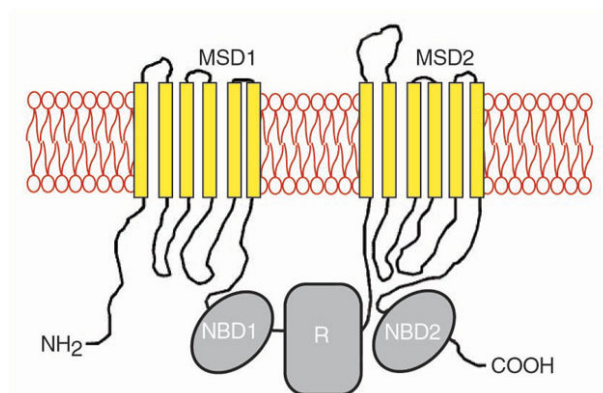


Figura 2: Estrutura da proteína CFTR, onde MSD1 e MSD2 são os domínios membranares constituídos por 6 regiões transmembranas cada, NBD são os domínios de ligação à ATP, e R o domínio regulatório (adaptado de <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/CftrDomainPage.html>).

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

1.3.3 Funcionamento da proteína CFTR

A CFTR é primariamente um canal de cloro, mas sua função é complexa, envolvendo o transporte de outros íons e moléculas, através do controle do funcionamento de outros canais de membrana. Dentre os canais que ela controla, três merecem atenção especial: ENaC, que é um canal de sódio; ORCCs (*Outwardly Rectified Chloride Channels*), que também é um canal de sódio, e um canal de potássio (Mcauley e Elborn, 2000).

A consequência da perda de função da proteína varia de acordo com o tecido e ou órgão acometido. Nas glândulas sudoríparas, a CFTR funciona reabsorvendo o cloro do lúmen da glândula. Quando defeituosa, o cloro deixa de ser reabsorvido ficando em concentrações elevadas no

lúmen. Como a CFTR também regula ORCC e ENaC (Devlin, 1998), e na sua ausência, o cloro não é reabsorvido, o ORCC se torna inativo e o sódio, devido à hiperatividade do ENaC, é hipersecretado, fazendo com que o cloro e o sódio sejam encontrados em concentrações elevadas no suor, levando ao conhecido suor salgado desses pacientes, utilizado no diagnóstico clínico (Hull, 2003).

Já no pulmão e no intestino, a CFTR atua secretando o cloro, e não o reabsorvendo como ocorre nas glândulas sudoríparas (Hull, 2003). Portanto, o funcionamento inadequado da CFTR, provoca o acúmulo do íon cloro dentro da célula, causando aumento do influxo de sódio através do ENaC, com o objetivo de preservar o equilíbrio eletroquímico (Figura 3) (Reis e Damaceno, 1998). A combinação do aumento da reabsorção de sódio e água, através do ENaC, e a diminuição da secreção do íon cloro, pela ausência ou mau funcionamento da CFTR, resulta na diminuição do líquido de superfície das vias aéreas e na desidratação das secreções respiratórias, aumentando a viscosidade e reduzindo o *clearance* mucociliar. As secreções espessas provocam a obstrução dos ductos e a retenção de microrganismos, favorecendo a proliferação bacteriana. Esse processo também aumenta a chance de desenvolvimento do íleo meconial ou equivalente meconial em adultos (Greger et al., 2001; Ribeiro et al., 2002; Gibson et al., 2003; Barth, 2004).

1.3.4 Mutações no gene *CFTR*

Já foram descritas mais de 1600 mutações em todo o gene *CFTR*. A frequência dessas mutações varia de acordo com o grupo étnico e localização geográfica da população estudada. Algumas mutações como, por exemplo, a $\Delta F508$, N1303K e G542X são mundialmente frequentes. A maioria das mutações, entretanto, é pouco frequente e somente encontradas em alguns grupos familiares.



Figura 3: Representação esquemática do funcionamento da CFTR no pulmão (Tsui e Durie, 1997).

As mutações ocorrem ao longo de todo gene, e são de todos os tipos: 42% delas são mutações de ponto, onde há a troca de apenas um aminoácido; 16% são de erro na matriz de leitura, levando à produção de uma proteína truncada; 12% são de *splicing*; 10% são sem sentido, que levam à criação de um sítio de parada da transcrição prematuro; 5% são inserções e deleções que podem ser tanto de apenas um par de bases como de mais e 15% são variações na sequência do gene que não acarretam em consequências clínicas aos seus portadores (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Embora o número de mutações seja elevado, a $\Delta F508$ é responsável por cerca de 70% dos casos da doença em todo o mundo, e é caracterizada pela deleção de três pares de bases, CTT no *exon* 10 do gene *CFTR* (Kerem et al., 1989), que acarreta na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína resultante (Figura 4). Trata-se da mutação mais frequente, mas sua incidência é variável nas diferentes regiões estudadas. Na Austrália, a $\Delta F508$ é encontrada em 90% dos indivíduos com FC (Gaskin, 2004); já no Chile 29% e na Argentina 62% (Streit et al., 2003); 69% nos EUA (Bobadilla et al., 2002) e 43,5% na Espanha (Gómez-Llourant et al., 2001).

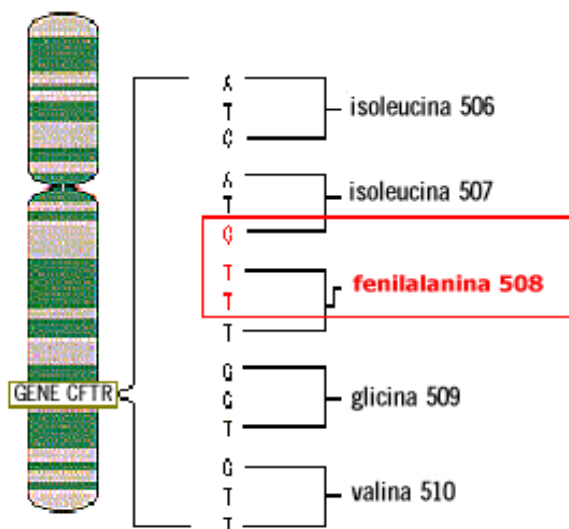


Figura 4: Representação esquemática da mutação $\Delta F508$ no gene *CFTR* caracterizada pela deleção de 3 pares de bases no *exon* 10: $\Delta F508$ (Adaptado de Welsh e Smith, 1993).

Devido à importância da FC e à frequência elevada da $\Delta F508$, foi realizado um esforço conjunto de pesquisadores visando o mapeamento dessa mutação no continente europeu (*European Working Group*, 1990), demonstrando uma variação significativa na frequência da mutação pelo continente, sendo encontrada em 30% dos alelos na Turquia e 88% na Dinamarca. Sua distribuição mostra uma diminuição em sua frequência do noroeste para o sudeste da Europa (Alibakhshi et al., 2008). Segundo Bobadilla et al. (2002), a mutação é encontrada em 70,27% dos alelos no norte da Europa e 50,03% no sul.

Na região de Campinas, a $\Delta F508$ é encontrada com uma frequência geral de 50% entre os pacientes (Correia, 2005), que é muito similar à de Portugal, Espanha e Itália, devido à colonização ocorrida no Brasil por esses países. Deste modo, não sendo a população brasileira etnicamente homogênea, a frequência das mutações neste país varia entre as regiões. Com relação à $\Delta F508$, no

Rio de Janeiro foi encontrada em 30% dos cromossomos pesquisados (Cabello et al., 2001) e no Rio Grande do Sul em 59% (Raskin et al., 1993).

Em relação à frequência, as seguintes mutações também têm importância: G542X, G551D, no *exon* 11 e N1303K no *exon* 21. A mutação G542X é encontrada com uma frequência de 2,4% (Lucotte et al., 1995). Hamosh et al. (1992) indicaram que a mutação G551D é a terceira mutação mais comumente associada como causadora da FC, apresentando frequência global de 3,1%. A mutação N1303K é a quarta mais frequente com 1,3% (Dawson e Frossard, 2000).

Na região de Campinas a frequência da $\Delta F508$ foi de 50% dos alelos analisados, seguida pelas mutações G542X (4,29%), N1303K (1,43%) E R553X (0,71%) (Correia, 2005).

1.3.5. Classes de mutação no gene *CFTR*

Cada mutação no gene *CFTR* afeta a proteína através de modos diferentes, dependendo de sua natureza e do local no gene onde ela ocorre. Deste modo, as mutações foram divididas em cinco classes de acordo com a característica que conferem à proteína (Zielenski e Tsui, 1995) (Figura 5).

As mutações agrupadas na classe I são aquelas que levam à produção dos fenótipos mais severos, pois não há síntese de proteína, ou há a produção de uma proteína truncada por causa da criação de um códon prematuro de parada da transcrição. Nessa classe está a segunda mutação mais frequente, G542X (Rowntree e Harris, 2003).

Já na classe II estão as mutações em que ocorre um processamento defeituoso da proteína, impedindo sua correta maturação, portanto evitando que ela chegue à membrana e assuma sua conformação correta. Faz parte da classe a mutação mundialmente mais frequente, a $\Delta F508$ (Slieker et al., 2005). Mickle e Cutting (2000) definem os pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$, como os que possuem fenótipo clássico da doença, o que inclui elevadas concentrações de eletrólitos no suor, insuficiência pancreática e doença pulmonar obstrutiva.

Na classe III as mutações afetam o domínio regulatório, ocorrendo o amadurecimento e posicionamento da proteína na membrana celular, mas seu funcionamento não ocorre corretamente. Como exemplo, tem-se a mutação G551D (Kerem, 2006).

Quando ocorre a correta localização da proteína na membrana com resposta à estimulação do ATP, mas há uma diminuição na condução de íons cloro e no tempo de abertura do canal, têm-se as mutações de classe IV. São exemplos, as mutações R117H e R347P (Gracia et al., 2005).

Enquadram-se na classe V as mutações que produzem uma menor quantidade de proteína. Essas mutações geralmente afetam sítios de *splicing*, como a IVS5T. Mesmo com a mutação, o *splicing* de *RNA* pode ocorrer corretamente, e assim uma pequena quantidade da proteína funcionará normalmente (Vankeerberghen et al., 2002).

Recentemente, o número de classes foi estendido para seis (Vankeerberghen et al., 2002), e nesta classe, as mutações se caracterizam por alterações de nucleotídeos que afetam as propriedades regulatórias do CFTR. Por exemplo: a mutação A455E, localizada no *exon 9* do gene *CFTR*.

As classes de um até três são classificadas como as de fenótipo mais severo, já que englobam mutações que levam à produção de pouca ou nenhuma proteína funcional. Já as mutações agrupadas nas três últimas classes estão associadas com alguma secreção de cloro, embora esta represente apenas 10% do normal e, portanto caracterizam fenótipos mais leves (Zielenski e Tsui, 1995).

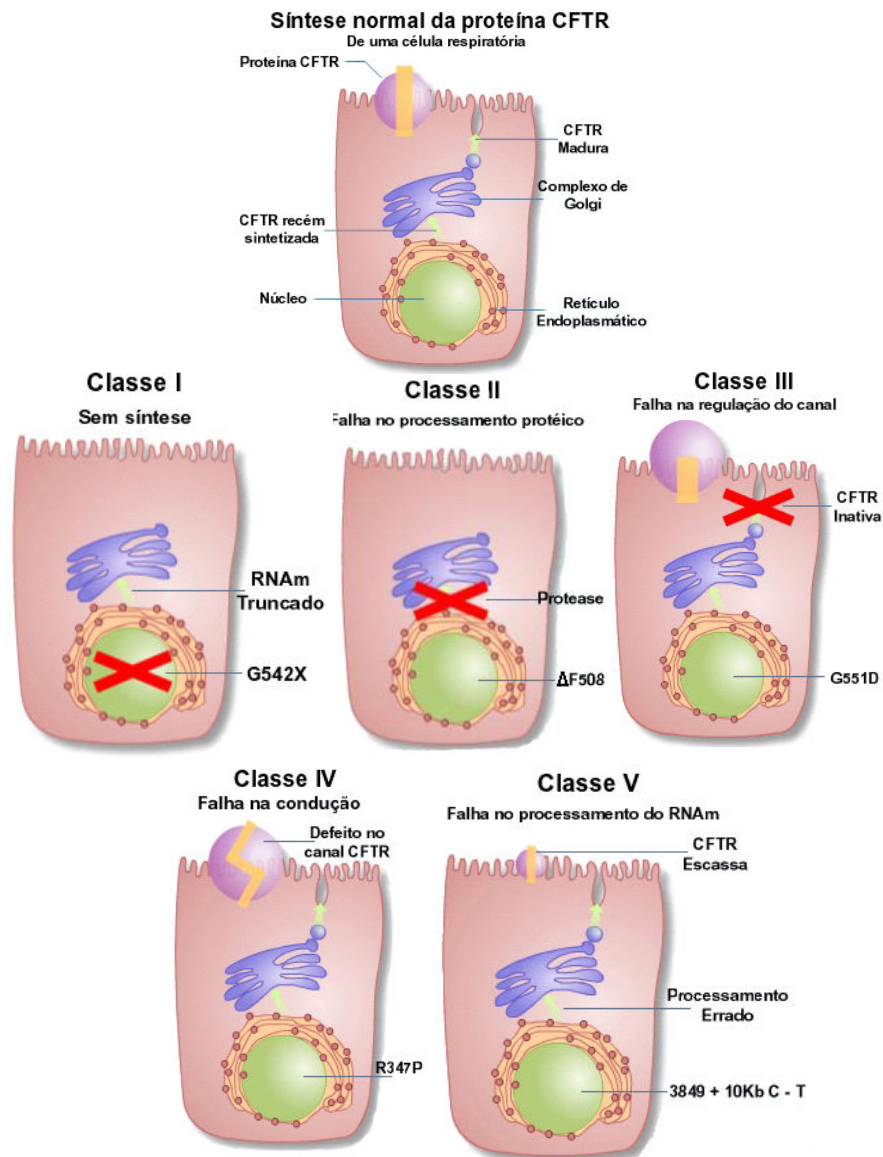


Figura 5: Representação esquemática das cinco classes de mutações conhecidas como causadoras da FC, mostrando sua consequência para a formação da proteína (Adaptado de <http://www.planetegene.com/view/les-differentes-classes-de-mutations-de-la-protein>).

Kerem (2006) sugeriu diferenças no tratamento dos pacientes com FC de acordo com a classe da mutação que eles possuem. Esta foi a primeira descrição fármaco-genômica para a doença. Porém, nem sempre existe uma correlação tão significativa entre o tipo de mutação e o fenótipo do paciente.

1.4. Correlação genótipo - fenótipo

A apresentação clínica da doença é muito variável (Bienvenue, 1997), enquanto alguns pacientes morrem muito cedo por causa da ocorrência do íleo meconial ou complicações respiratórias, outros possuem uma forma mais leve e vivem por muitos anos.

A capacidade do genótipo de predizer a gravidade da doença está diretamente relacionada ao órgão acometido. Quando se trata das glândulas sudoríparas, pâncreas e sistema reprodutor, existe uma forte correlação entre genótipo e fenótipo. Mas quando o órgão acometido é o pulmão, há uma grande dificuldade em se estabelecer esta correlação (Barth, 2004).

Mickle e Cutting (2000) descrevem que a mutação $\Delta F508$ em homozigose ou juntamente com outra mutação grave, leva ao quadro clássico da FC. Estes mesmos autores também observaram que os pacientes que apresentavam a mutação $\Delta F508$ na sua forma homozigota tinham, em geral, um prognóstico pior, associado com insuficiência pancreática, doença pulmonar mais grave e colonização precoce por *P. aeruginosa*.

A correlação genótipo-fenótipo na manifestação pancreática está bem estabelecida. Observou-se que o paciente que possui uma função pancreática normal, ou seja, pancreático suficiente, é portador de pelo menos uma mutação leve (classe IV e V). Já os indivíduos que não possuem uma função pancreática normal, ou seja, pancreáticos insuficientes são homozigotos ou heterozigotos compostos para duas mutações severas (classes I, II ou III) (Rowntree e Harris,

2003). Isto ocorre porque as mutações leves permitem que haja alguma proteína atuante e assim o pâncreas desempenha uma função residual (Kristidis et al., 1992).

A azoospermia por obstrução do canal deferente, secundária a CBAVD (agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes), é também uma manifestação clínica de expressão bastante homogênea entre os pacientes com FC. Phillipson et al. (2000), em seu estudo com 25 homens sem FC que apresentavam CBAVD, pesquisou as seguintes mutações: $\Delta F508$, $\Delta I506/7$, G551D, G542X, R117H, R117C, R553X e W1282X, e encontraram que 60% deles carregavam uma mutação no gene *CFTR*, 20% eram heterozigotos compostos e 20% não tinham uma mutação identificada neste gene.

Estudos têm demonstrado a associação de um polimorfismo, o IVS8-5T, com a CBAVD, que é uma variação de timinas no *intron* 8 do *CFTR*. Três alelos diferentes podem ser encontrados apresentando cinco, sete ou nove repetições (Chu et al., 1991). O alelo com cinco repetições, chamado 5T, está associado à CBAVD (Salvatore et al., 2002). O número de timinas determina a eficiência do processamento deste *intron* que diminui quanto menor forem os resíduos encontrados. Assim, cadeias menores de timinas determinam a não tradução do *exon* 9 e conseqüentemente ocorrem níveis menores de proteína formada ou níveis menores da proteína normal (Chu et al., 1991).

A relação já bem estabelecida no pâncreas e relativas a mutações leves de atenuarem a gravidade da doença digestiva não acontece com a doença pulmonar. A doença pulmonar é influenciada por fatores ambientais, como a idade do paciente ao diagnóstico, o estado nutricional, exposição ao tabaco, aderência ao tratamento (Mahadeva e Lomas, 2000) e também por fatores genéticos como variações em *introns* e genes modificadores (Kerem e Kerem, 1996).

Mekus et al. (2000), em seu estudo com gêmeos, demonstraram que deve haver um componente genético, em adição às mutações no gene *CFTR*, que interfere na modulação do fenótipo da doença.

1.5. Genes modificadores

Genes modificadores são genes distintos daquele causador da doença, que acarretam em diferenças quantitativas ou qualitativas no fenótipo, ou seja, que modulam as características geradas pelas mutações no gene principal.

O conceito de genes modificadores em relação a doenças monogênicas, como a FC, é distinto daquele das doenças complexas. Nas complexas, múltiplas variações genéticas interagem entre si e com o meio ambiente para gerar uma característica. Já nas monogênicas, qualquer alteração que esteja relacionada ao fenótipo gerado pelas mutações no gene principal, pode influenciar a gravidade da doença (Figura 6). Polimorfismos que aparentemente não tem nenhum efeito em indivíduos normais podem ser modificadores da doença na FC (Knowles, 2006).

Estudos com ratos geraram fortes evidências de que a constituição genética é de grande importância para a apresentação fenotípica nas doenças monogênicas, o que dá suporte a idéia de que fatores além do *CFTR* podem modificar o fenótipo pulmonar apresentado na FC (Nadeau, 2001).

Indivíduos com FC que possuem as mesmas mutações podem possuir grandes diferenças em relação à apresentação clínica da doença (Accurso e Sontag, 2003; Knowles, 2006). Borgo et al. (1993) comprovaram este dado através de estudo realizado com um par de gêmeos dizigóticos heterozigotos compostos ($\Delta F508/1717-1G \rightarrow A$). Embora a insuficiência pancreática fosse encontrada nos dois irmãos, a gravidade da doença pulmonar era variável.

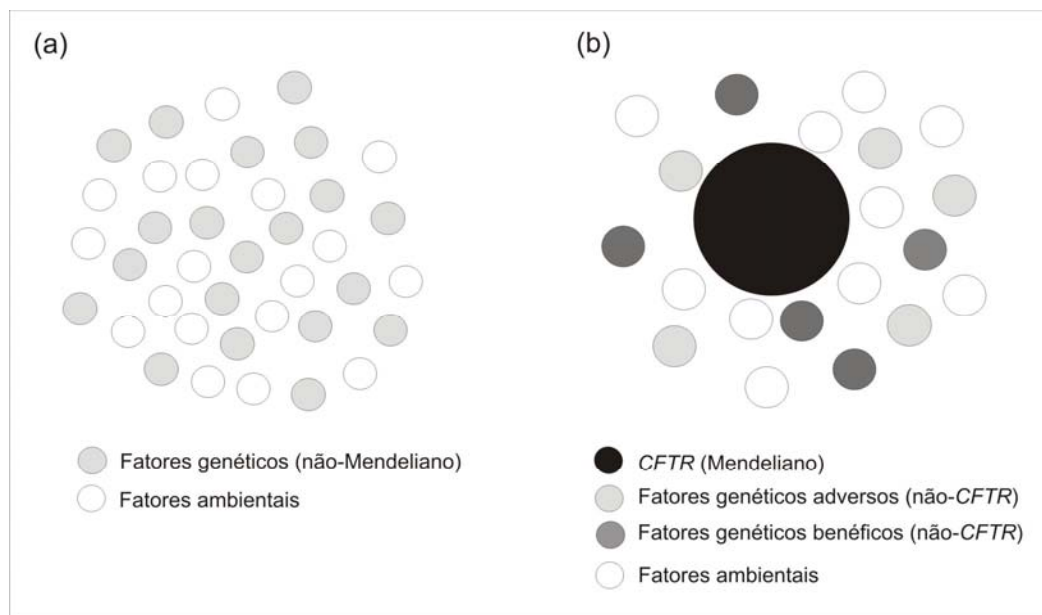


Figura 6: Variantes genéticas múltiplas na doença mendeliana e na doença não mendeliana. (a) Variantes genéticas múltiplas e influências ambientais interagem para causar doença, como na asma. (b) Interação do gene *CFTR* e variações genéticas não ligadas ao gene *CFTR* (ambos desfavoráveis ou benéficos), que modificam a gravidade da doença, em conjunto com fatores ambientais (adaptado de Knowles, 2006).

Crianças com o mesmo genótipo, mesmo irmãos fraternos (Hull, 1993) ou gêmeos monozigóticos, que dividam o mesmo ambiente demonstram diferenças em relação à gravidade da doença. Gêmeos monozigóticos têm maior concordância em relação ao *status* nutricional e a gravidade da doença pulmonar do que os dizigóticos, o que sugere que a gravidade da doença na FC seja modulada por outros fatores genéticos além do *CFTR* (Slieker et al., 2005, Merlo e Boyle, 2003; Wright et al., 2006; Boyle, 2007). Portanto, o quadro clínico de cada paciente depende não somente do tipo, ou de qual mutação ele possui, mas também de qual e de como os genes modificadores estão interagindo com o gene principal.

Os genes modificadores podem influenciar o fenótipo através de muitos mecanismos. Em nível molecular podem regular a condução do íon cloro, o *splicing* e a expressão da proteína CFTR. Também podem regular a inflamação e a infecção bacteriana. Além disso, o quadro pulmonar pode ser modificado por genes que regulam o dano e o reparo do tecido epitelial e genes que estejam associados com o *clearance* mucociliar (Slieker et al., 2005).

Genes que codificam proteínas presentes em outros sistemas, como o sistema imunológico, o sistema de reparo do epitélio, o sistema de transporte de íons pelos canais não CFTR e a ocorrência de inflamação podem influenciar de forma indireta a gravidade da apresentação da doença (Davies, 2003).

Dentre os genes que poderiam estar modulando o fenótipo da FC estão: *TNF α* (fator de necrose tumoral), *ADIPOQ* (adiponectina) e o *STATH* (estaterina) que são o objeto de estudo deste trabalho e serão apresentados em seguida.

1.5.1. O fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF é uma citocina pró-inflamatória multifuncional produzida principalmente pelos macrófagos. É também chamado de $TNF\alpha$ por razões históricas e para distingui-lo do $TNF\beta$, ou linfotoxina, intimamente relacionados. É o principal mediador da resposta inflamatória aguda a bactérias gram negativas e outros microrganismos infecciosos e também é responsável por muitas complicações sistêmicas graves (Abbas, 1995).

A principal função fisiológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativar essas células para erradicação de microrganismos. O TNF faz com que as células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão que tornam a superfície endotelial adesiva para leucócitos no local da infecção (Abbas, 1995; Buscher e Grasemann, 2006).

Também está envolvida na regulação de um grande número de processos biológicos como, proliferação e diferenciação celular, apoptose, metabolismo lipídico e coagulação sanguínea.

A ação do TNF no endotélio e nos leucócitos é crítica para as respostas inflamatórias locais a microrganismos, e se este não estiver presente em quantidades suficientes, pode haver um fracasso na contenção das infecções. Em infecções graves o TNF é produzido em grandes quantidades, o que pode causar anomalias clínicas e patológicas, como a caquechia, que é a perda de células musculares e adiposas pela ação do TNF (Spies et al., 1986).

O gene *TNF α* foi localizado através de *southern blot* dentro da região que codifica o complexo maior de histocompatibilidade (MHC), no braço curto do cromossomo 6 região 21.3, possui 3kb, contém quatro *exons* e codifica uma proteína de 157 aminoácidos (Nedwin et al., 1985). Apresenta-se em tandem com o gene *TNF β* e se localiza entre as classes I e II do cluster do MHC (Herrmann et al., 1998). A regulação da produção do TNF ocorre em níveis transcricionais e pós-transcricionais sendo que diferenças em sua produção são parcialmente determinadas geneticamente (Wilson et al., 1993; Huang et al., 1997). Polimorfismos na região promotora são de grande importância para sua produção, já que parece haver uma relação entre variações na expressão de *TNF* e polimorfismos nessa região.

Polimorfismos na região promotora do gene *TNF α* estão associados com uma doença pulmonar mais severa na FC (Hull e Thompson, 1998). Níveis elevados dessa citocina também foram encontrados em lavados bronquioalveolares de pacientes com bronquite crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sugerindo que ele contribua para o remodelamento das vias aéreas além de alterações na função do músculo liso encontrada na DPOC (Higham et al., 2000).

O TNF foi encontrado em altas concentrações nos pulmões de pacientes com FC, sugerindo sua ação como promotora da inflamação encontrada na doença (Hull e Thompson, 1998; Cigana et

al., 2007). Também foi descrita a relação entre o TNF e uma resistência inata a infecções pela bactéria *P. aeruginosa*, (Yarden et al., 2005). Polimorfismos neste gene podem aumentar a capacidade do pulmão em eliminar a *P. aeruginosa* (Yarden, et al., 2005).

Um polimorfismo na região promotora do gene, que resulta na substituição de uma guanina por uma adenina na posição -308, em relação ao sítio de início da transcrição da região promotora do gene, foi descrito como sendo importante na resposta de defesa produzida pelo *TNF α* . Dois alelos foram descritos para esse polimorfismo: TNF1 e TNF2, onde o alelo G foi denominado como 1, e o alelo A como 2 (Higham et al., 2000). O TNF2 é um alelo raro e está associado a um aumento da transcrição desse gene em relação ao alelo um, e ainda apresenta uma associação positiva com muitas doenças inflamatórias, entre elas um risco aumentado de desenvolvimento de bronquite crônica e DPOC (Higham et al., 2000; Sakao et al., 2001).

Em relação à FC, esse alelo é responsável por uma apresentação mais severa da doença (Hull e Thompson, 1998). Slieker 2005 descrevem que o TNF2 está associado com uma maior transcrição do gene e que indivíduos que possuem esse alelo têm uma pior prova de função pulmonar e menor valor de IMC, comparados com aqueles que não o possuem. O TNF contribui para a fisiopatologia da doença por induzir a cachexia e a perda de peso, promovendo a infiltração de neutrófilos nas vias aéreas, e potencialmente reduzindo a expressão do *CFTR* através da desestabilização do seu RNA mensageiro (Acton e Wilmot, 2001). Indivíduos que possuem o TNF2 em pelo menos um alelo têm um menor VEF1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo) e escore Z, do que indivíduos que homozigotos para o alelo um (Acton e Wilmot, 2001). Os índices VEF1 e o escore Z que avalia as variações antropométricas, são marcadores da gravidade do acometimento pulmonar.

Outro polimorfismo, que também leva à troca de uma guanina por uma adenina na posição -238 na região promotora, demonstra resultados contrastantes. Pociot et al. 1995 demonstrou não

haver relação entre esse polimorfismo e a produção de TNF. Entretanto, Huizinga et al. (1997) mostra haver uma associação do alelo G com um aumento da produção de TNF. Buranawuti et al. 2007, descreve que indivíduos fibrocísticos heterozigotos para esse polimorfismo parecem ter uma chance aumentada de sobrevivência além dos 17 anos de idade. Ou seja, haveria uma associação desse polimorfismo com a sobrevivência dos pacientes com FC.

1.5.2. A adiponectina (ADIPOQ)

O gene *ADIPOQ* localiza-se no braço longo do cromossomo 3 região 2.7, compreende três *exons* e codifica uma proteína denominada adiponectina (Ouchi et al., 1999), que é também chamada de GBP38, adipoQ, apM1 ou Acpr30 e faz parte de um grupo de substâncias biologicamente ativas denominadas adipocinas que são produzidas pelos adipócitos. Essas substâncias desempenham um papel importante na sensibilidade à insulina, doença vascular e resposta imunológica (Prins, 2002).

A adiponectina é expressa quase que exclusivamente no tecido adiposo, mas recentemente sua expressão também foi descrita em outros tecidos como o ósseo, glândulas mamárias e salivares entre outras, que são capazes de expressá-la mesmo que em pequena quantidade (Garaulet et al., 2007). Su et al. 2002, descrevem sua expressão também na traquéia, pele, glândula adrenal, timo e tireóide. Esta proteína é muito abundante na corrente sanguínea onde representa 0.01% das proteínas totais do plasma (Vasseur et al., 2006).

Em sua estrutura básica a adiponectina consiste de 244 aminoácidos que compõem quatro domínios: uma sequência N-terminal, um domínio variável, um domínio colágeno e um domínio globular C – terminal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=605441>). Além de sua função na modulação da sensibilidade à insulina (Boyle, 2007), metabolismo energético e a

sensibilidade à glicose (Yamauchi et al., 2002), também pode agir na resposta antiinflamatória (Lappas et al., 2005).

A adiponectina ocorre tanto em sua forma completa, como também em fragmentos e consiste no domínio globular C-terminal, sendo conhecida como adiponectina globular. Em sua forma completa ela pode adquirir diferentes configurações como monômeros e trímeros que ainda podem associar entre si através dos domínios de colágeno em grupos de quatro a seis e assim resultar em oligômeros de alto peso molecular (Tilg e Moschen, 2006; Garaulet et al., 2007) (Figura 7).

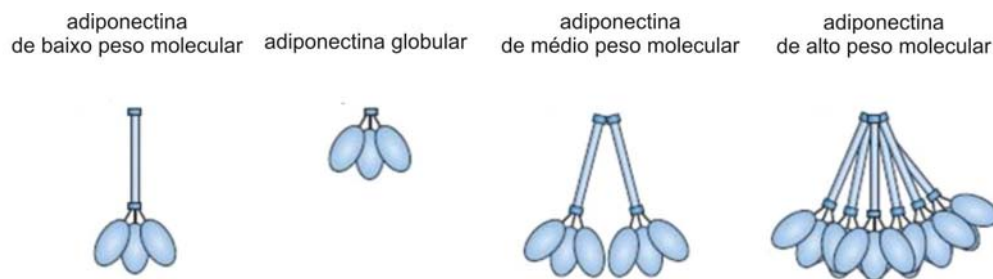


Figura 7: Diferentes configurações da adiponectina (adaptado de Garaulet et al., 2007).

Wolf et al. 2004 descreveram pela primeira vez que a adiponectina modula a produção de citocinas em uma grande variedade de tipos de células mielóides e também induz a produção do mediador antiinflamatório IL-10 que têm um potente efeito antiinflamatório e imunossupressor em células hematopoiéticas.

Polimorfismos funcionais no gene *ADIPOQ* têm sido identificados como influenciadores dos níveis de adiponectina circulante (Vasseur et al., 2005) e são esses polimorfismos que resultam em altos níveis de adiponectina, em indivíduos com FC, podendo levar a uma apresentação mais moderada da doença através da supressão da inflamação relacionada à doença, além de melhorar o status nutricional (Boyle, 2007). Estudos demonstram que a adiponectina atenua a produção de citocina pró-inflamatórias circulantes, como o TNF α em macrófagos humanos (Wolf et al., 2004). Wright et al. 2006, em um estudo de análise por *microarray* em epitélio nasal em indivíduos $\Delta F508/\Delta F508$, encontraram o gene *ADIPOQ* mais expresso em indivíduos que apresentam uma doença pulmonar moderada.

1.5.3. A estaterina (STATH)

O gene *STATH* localiza-se no braço longo do cromossomo 4 região 11-13, compreende cinco *exons*, codificando a proteína estaterina (Sabatini et al., 1987). Trata-se de um peptídeo antimicrobiano presente na saliva, vias aéreas superiores e secreções nasais que participa do desenvolvimento do biofilme da cavidade oral mediando a adesão de bactérias (Boley, 2007). Ultimamente esta proteína foi identificada como sendo proeminente na interface da saliva com o ar atmosférico (Proctor et al., 2005; Wright et al., 2006). Tem um importante papel na manutenção da saúde oral, funcionando na ligação com o cálcio e na inibição do crescimento de cristais, exibindo alta afinidade por superfícies com hidroxiapatita.

Como mediadora da adesão de bactérias, a estaterina possui epítomos que promovem o crescimento e adesão na cavidade oral de alguns microrganismos, como *Porphyromonas gingivalis*, enquanto inibe o crescimento de outros, como *S. aureus* (Nieme e Johansson, 2004). Embora sua ação antibacteriana em relação à *P. aeruginosa* ainda não tenha sido investigada, e sabendo-se que a infecção por essa bactéria acelera o declínio na função pulmonar (Nixon et al., 2001), uma proteína

que aja determinando a adesão bacteriana na cavidade oral e vias aéreas superiores é de extremo interesse.

A confirmação da existência de outros genes que estejam modificando o quadro clínico de pacientes com FC terá uma potencial aplicação em relação ao prognóstico desses indivíduos (Accurso e Sontag, 2003). Pacientes encontrados em maior risco de desenvolverem complicações, serão acompanhados com maior frequência e o tratamento poderá ter início antes mesmo dos sintomas aparecerem. Também permitirá um melhor entendimento da fisiopatologia da doença além de um grande número de pesquisas com o intuito de caracterizar os mecanismos de atividade da doença. Esta confirmação pode possibilitar o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para minimizar as consequências da doença (Collaco e Cutting, 2008).

A estaterina foi encontrada com uma atividade significativamente maior em indivíduos homozigotos $\Delta F508$ com doença pulmonar moderada. Esse aumento de expressão foi confirmado através de análise do RNA mensageiro produzido pelo gene *STATH* em uma amostra adicional de 12 indivíduos com apresentação severa e moderada da doença pulmonar (Long e Langley, 1999). Wright et al., 2006, em um estudo de análise por *microarray* em epitélio nasal em indivíduos $\Delta F508/\Delta F508$, encontraram o *STATH* mais expresso em indivíduos classificados como apresentando doença pulmonar moderada. Esses dados foram confirmados por meio da análise de outros 12 indivíduos que apresentavam doença pulmonar moderada e grave.

2. Objetivos

- Determinar a frequência dos polimorfismos -308G/A e -238G/A do gene *TNF α* entre portadores de Fibrose Cística;
- Verificar a existência de associação entre polimorfismos no gene *TNF α* e a gravidade do quadro pulmonar;
- Identificar alterações de sequência nos *exons* e junções *exon/ intron* dos genes *ADIPOQ* e *STATH*;
- Verificar existência de associação entre possíveis variações nos genes *ADIPOQ* e *STATH* e a gravidade da FC.

3. Casuística e Métodos

3.1. Aspectos Éticos

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

3.2. Casuística

Foram analisados 49 pacientes com FC em seguimento no Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, coordenado pelo Dr. Antonio Fernando Ribeiro que é médico gastropediatra especializado em FC e pelo Dr. José Dirceu Ribeiro, médico pneumopediatra especializado em FC.

Foram incluídos apenas indivíduos homozigotos para a mutação $\Delta F508$ ou heterozigotos compostos para mutações de classe I ou II ou ainda homozigotos para mutações de classe II, que são alterações que não levam à formação de proteína funcional. Os pacientes apresentaram alteração de eletrólitos no suor, confirmado por pelo menos dois testes de cloro realizados em duas ocasiões diferentes, com valores iguais ou superiores a 60mEq/L, pelo método de iontoforese por pilocarpina de Gibson e Cooke (1959). A seleção de indivíduos que possuem duas mutações já conhecidas é importante, pois deste modo minimizaremos a ação do genótipo *CFTR* na apresentação clínica.

3.3. Métodos

As análises laboratoriais dos pacientes foram realizadas através de amostra de sangue periférico, a partir da qual foram realizados os procedimentos esquematizados na figura 8.

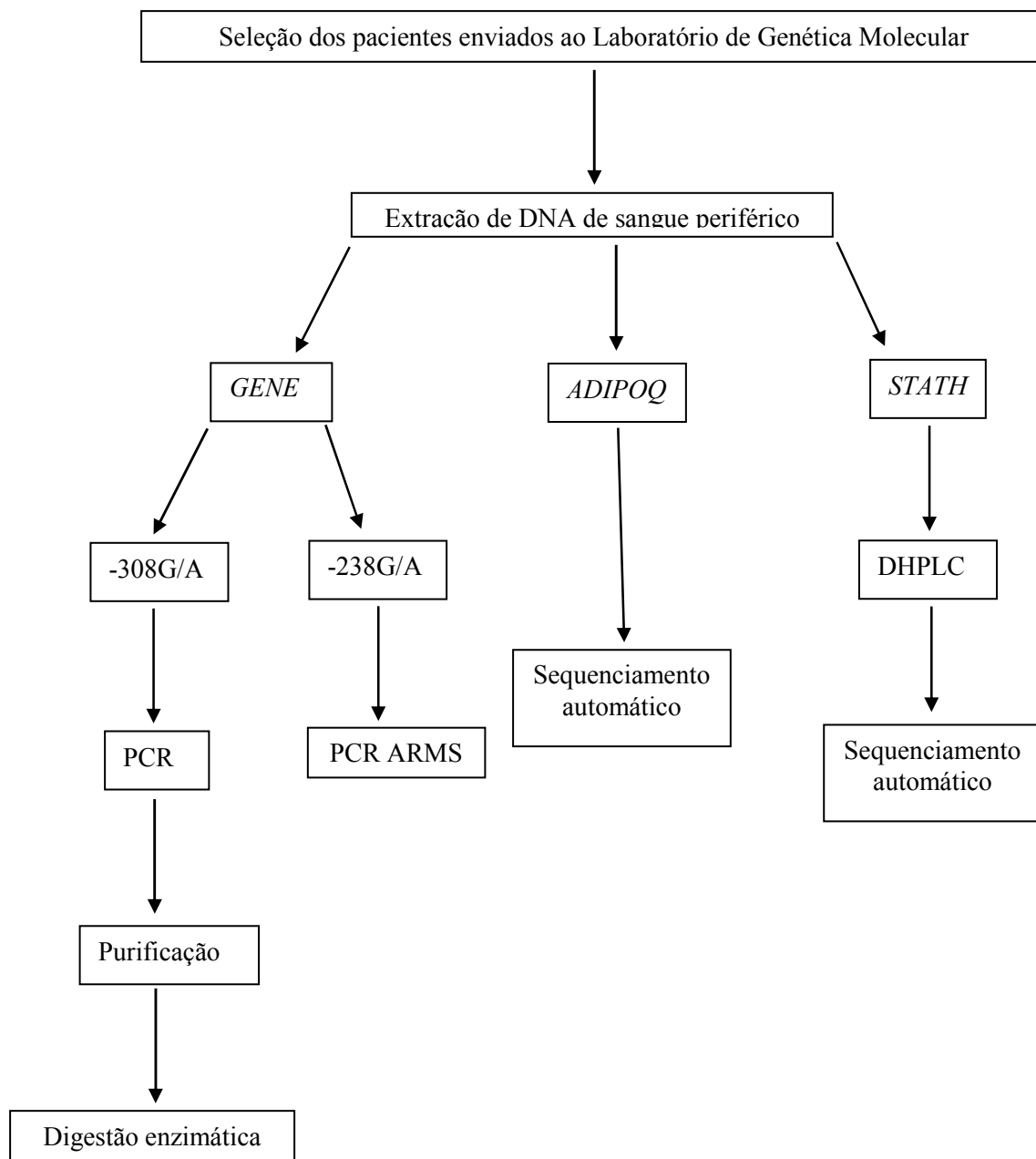


Figura 8: Organograma de todos os procedimentos utilizados para a análise laboratorial.

3.3.1. PCR

Para análise dos polimorfismos no gene *TNF α* e dos genes *ADIPOQ* e *STATH* foi realizada a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) (Saiki et al., 1985). A PCR possibilita a amplificação exponencial, ou seja, a formação de cópias de uma sequência de DNA de interesse, através de variações cíclicas de temperatura. Para a realização da PCR é necessário que a reação possua, além do DNA genômico, uma solução de desoxinucleotídeos (dNTP), que são os nucleotídeos livres que serão usados para a formação das novas fitas de DNA; dois iniciadores – *primers*, que hibridizam no DNA genômico e delimitam a região do DNA a ser amplificada; tampão para dar condições ótimas para que a reação ocorra; enzima *Taq* DNA polimerase, e seu co-fator cloreto de magnésio ($MgCl_2$), responsável por fazer a extensão das novas fitas de DNA. O ciclo da PCR é composto por três fases: a) desnaturação, qual ocorre a separação da dupla fita do DNA; b) anelamento, quando os iniciadores se hibridizam com a sua sequência complementar no DNA; c) extensão, quando ocorre a amplificação propriamente dita da sequência de interesse.

O procedimento utilizado em cada uma das reações está resumido na tabela 1. Os programas utilizados para cada uma das reações estão resumidos na figura 9. As temperaturas de anelamento utilizadas para a amplificação dos genes *ADIPOQ* e *STATH* encontram-se descritos na tabela 2. Para o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* , após a PCR ainda foi realizada digestão com enzima de restrição específica. Na tabela 3 está descrita a sequência dos iniciadores utilizados para a identificação do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e tamanho do fragmento gerado. Na tabela 4 encontra-se a descrição da sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes *STATH* e *ADIPOQ*.

Tabela 1: Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR.

Reagentes (μL)	-308G/A <i>TNFα</i>	-238G/A <i>TNFα</i>	<i>ADIPOQ</i>	<i>STATH</i>
DNA (ng)	50	50	50	50
Tris-HCl pH 8,4 (mM)	10	10	10	10
KCL (mM)	50	50	50	50
MgCl ₂ (mM)	1,67	1,67	1,5	1,5
dNTP (μM – cada)	125	125	80	80
iniciadores (pmoles)	10	7	10	10
Taq polimerase (U)	5	5	2,5	2,5
Água qsp (μL)	30	30	50	50

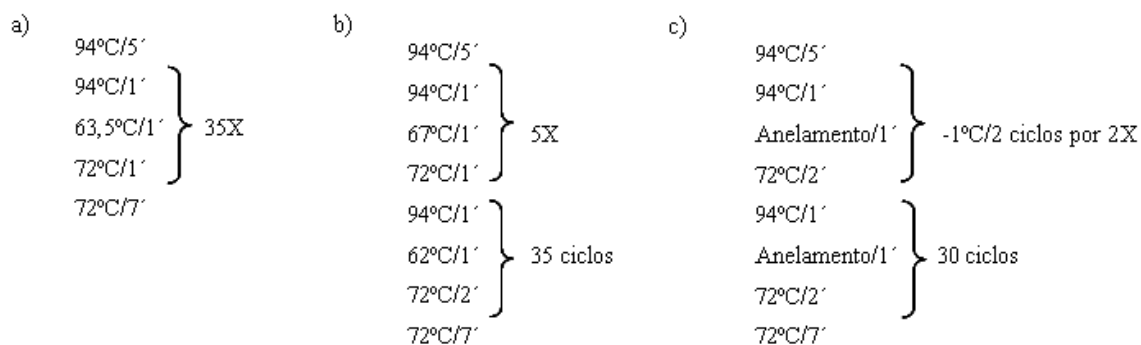


Figura 9: Programas utilizados para realização da PCR para: a) polimorfismo -308G/A do gene *TNFα*, b) polimorfismo -238G/A do gene *TNFα*, c) genes *ADIPOQ* e *STATH*.

Tabela 2: Descrição das temperaturas de anelamento utilizadas para as PCR dos genes *ADIPOQ* e *STATH*.

Gene	Localização	Temperatura de anelamento (°C)
<i>ADIPOQ</i>	<i>Exon 1</i>	63
	<i>Exon 2</i>	64,5
	<i>Exon 3a</i>	58
<i>STATH</i>	<i>Exon 2</i>	60
	<i>Exon 3 e 4</i>	63,5
	<i>Exon 5</i>	58

Tabela 3: Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e tamanho dos fragmentos resultantes.

Localização	Polimorfismo	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)
Região Promotora	-308G/A	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	345
		GAGCGTCTGCTGGCTGGGTG	

3.3.2. Digestão enzimática

Para detecção do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* , a PCR foi purificada e digerida com enzima de restrição específica – *NcoI* da empresa BioLabs. Para a purificação em um novo tubo, 10 μ L do produto da PCR foram misturados com 80 μ L de álcool isopropanol 75%, deixados descansar por 10 minutos e então centrifugados 13.000 r.p.m. por 30 minutos. Inverteu-se então o tubo e foram adicionados 150 μ L de álcool etanol 70% à temperatura ambiente e centrifugado novamente na mesma velocidade por 10 minutos. Depois da centrifugação, o tubo foi novamente invertido e deixado secar naturalmente, para que depois de seco fossem adicionados 10 μ L de água. A digestão enzimática foi realizada a partir de 10 μ L da PCR purificada, 2,0 μ L de tampão específico da enzima (10mM TRIS-HCL pH 7,5; 50mM KCL; 0,1mM EDTA; 1mM DTT; 0,2mg/mL BSA e 50% de glicerol) e 7,5 μ L de água e 0,5 μ L da enzima (*NcoI*) (5 unidades).

Tabela 4: Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR dos genes ADIPOQ e STATH e tamanho dos fragmentos resultantes.

Gene	Localização	Sequência 5'-3'	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>ADIPOQ</i>	<i>Exon 1</i>	TGAGTACCAGGCTGTTGAG	252
		GGAGAACGGAGGAAGAAG	
	<i>Exon 2</i>	AACTGGGTGTGTGTGTGG	322
		GTAGGAGGTCTGTGATGAAAG	
	<i>Exon 3a</i>	GGCAGGAGTTCTGTTCTTTG	300
		CAGGAATGTTGCAGTGAAT	
	<i>Exon 3b</i>	AACATGCCCATTCGCTTTAC	525
		TGTAATCCCTCAAGCAACCAC	
<i>STATH</i>	<i>Exon 2</i>	GCTTTGGAGCGTAGTATAATC	222
		AACACAAGGAATAGAGAGACTC	
	<i>Exon 3 e 4</i>	GGACTACACAGCATTATCAG	299
		GTGTCTATCGATGATTTGC	
	<i>Exon 5</i>	ACATTTCAAGGAGCTATACAGC	411
		AAACGCTTGCACTGTCATTATC	

A presença do alelo G, designado de 1, não forma sítio de reconhecimento para a enzima *NcoI*, permanecendo, portanto, o fragmento com o tamanho do produto gerado pela PCR (345pb). Já a presença do alelo A, designado de 2, cria um sítio de reconhecimento para enzima *NcoI* que cliva o produto da PCR em dois fragmentos de 320 e 25pb (Huang et al., 1997) (Tabela 5) (Figura 10).

Tabela 5: Descrição do tamanho do fragmento gerado através da digestão enzimática do fragmento que inclui o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* .

Polimorfismo	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento obtido pela PCR	Tamanho do alelo 1(pb)	Tamanho do alelo 2 (pb)
-308G/A	<i>NcoI</i>	345	345	325, 20

3.3.3. PCR ARMS

Para a análise do polimorfismo -238G/A no gene *TNF α* foi realizada a técnica ARMS (do inglês, *Amplification Refractory Mutation System*). Esta técnica que foi descrita por Ye et al. (2001), possibilita a diferenciação de alelos e baseia-se no mesmo princípio da PCR. Entretanto, são utilizados dois pares de iniciadores, cada um específico para amplificar um determinado alelo. Como controle interno de reação, foi realizada a amplificação de um gene distinto daquele de interesse (Yamamoto-Furusho et al., 2004) (Figuras 11 e 12). Os iniciadores e os tamanhos dos fragmentos específicos para amplificação do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* e do controle interno de reação, estão descritos na tabela 6.

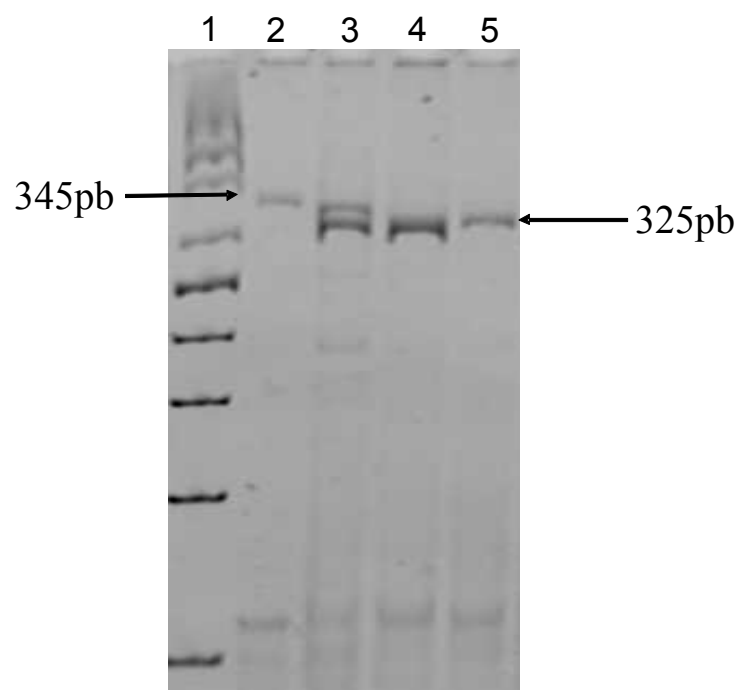


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não-desnaturante para detecção do polimorfismo –308G/A do gene *TNFα*: na coluna 1, marcador de peso molecular de 50pb; coluna 2 indivíduo portador do alelo 1 (345pb); na coluna 3 indivíduo heterozigoto para o alelo 1 e 2 (325 e 345pb) e nas colunas 4 e 5, indivíduos portadores do alelo 2 em homozigose (325pb).

Tabela 6: Descrição da sequencia dos iniciadores utilizados na PCR do polimorfismo –238G/A e controle interno de reação e tamanho dos fragmentos resultantes.

Localização	Polimorfismo	Alelo	Sequencia 5'- 3'	Tamanho do fragmento (pb)
Região Promotora	-238G/A	A	GCCCCTCCCAGTTCTAGTTCTATC	209
			CACACTCCCATCCTCCCTGGTCT	
		G	AGACCCCCCTCGGAATCG	447
			CCGGATCATGCTTTCAGTGC	
	Controle interno		GCCCCTCCAGTTCTAGTTCTATC	608
			CCGGATCATGCTTTCAGTGC	

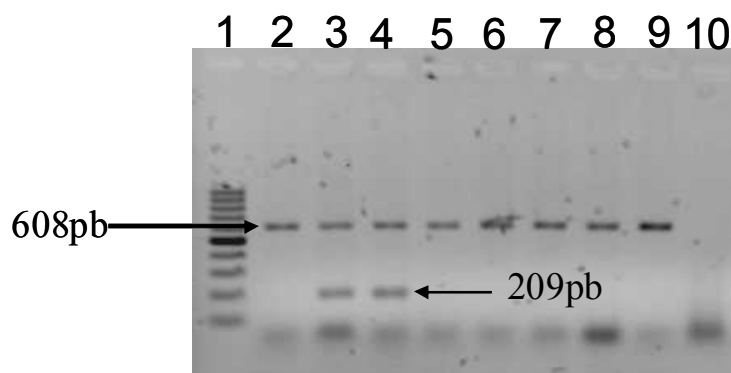


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação da variante -238A do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* : coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); nas colunas 3 e 4, indivíduos com amplificação do fragmento característico do polimorfismo (209pb); nas colunas 1, 5, 6, 7, 8, 9, ausência dessa amplificação; na coluna 10, controle negativo de reação. O fragmento de 608pb corresponde ao controle interno da reação.

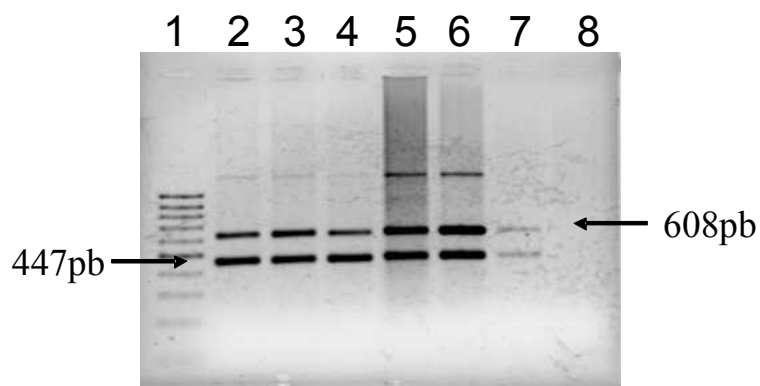


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação da variante 238G do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* : coluna 1, marcador de peso molecular (100pb); nas colunas de 2 a 7, indivíduos com amplificação do fragmento característico do polimorfismo (447pb); na coluna 8, controle negativo de reação. O fragmento de 608pb corresponde ao controle interno da reação.

3.3.4. DHPLC

A triagem de mutações no gene *STATH* foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta resolução por desnaturação - DHPLC (*Transgenomics WAVE® System 4500*), com a coluna DNasep®. Cada sequência amplificada foi submetida em análise no *Navigator™ Software* e as temperaturas de análise onde se obtém interação ideal com a coluna foi determinada.

Trata-se de um método que identifica fragmentos de DNA onde haja heterozigose e para isso baseia-se em dois princípios:

- a) Formação de heteroduplexes após desnaturação e renaturação lenta de fragmentos que sejam heterozigotos, pois indivíduos que são heterozigotos podem ter dois fragmentos do tipo selvagem se reanelando (homoduplexes), ou dois fragmentos que tenham alteração (homoduplexes), ou um fragmento que tenha alteração com outro do tipo selvagem, o que gerará um fragmento que não é completamente estável, ao contrário de fragmentos homoduplexes;
- b) Diferentes padrões de retenção que heteroduplexes e homoduplexes apresentam dentro da coluna.

O produto da amplificação por PCR é aquecido a 95°C por cinco minutos, seguido por uma redução lenta de temperatura (40 minutos a temperatura ambiente), que permite que as fitas de DNA se renaturem aos poucos, o que favorece que suas ligações fiquem levemente relaxadas. Durante a renaturação as fitas podem juntar-se formando uma dupla fita sem alteração, ou ainda formarem uma dupla fita sendo uma delas sem alteração e outra com alteração, denominados homoduplex e heteroduplex, respectivamente.

Após a formação dos duplexes, os fragmentos de DNA são passados por uma coluna de cromatografia líquida de fase reversa composta por partículas de poliestireno que foram carregadas positivamente pela passagem do tampão TEAA (acetato de trietilamônio). A carga negativa do DNA, em razão dos seus grupos fosfato, permite que os fragmentos fiquem aderidos à matriz da coluna através dos grupamentos amônia do tampão TEAA. A eluição das moléculas de DNA é feita

pela passagem de um solvente orgânico, a acetronila, que na medida em que aumenta sua concentração, diminui a atração entre os fragmentos de DNA e o TEAA. Os heteroduplexes, pela presença do mau pareamento são eluídos antes que os homoduplexes. Através de um detector ultravioleta a absorbância é medida e os resultados enviados para o computador, que fornece gráficos com picos que permitem a análise das mutações.

Resumidamente, as etapas após a extração de DNA do paciente estão listadas abaixo:

- a) Reação em cadeia da polimerase dos *exons* e junções *exon/ intron* do gene de interesse;
- b) Desnaturação (95°C por 5 minutos) e renaturação lenta (temperatura ambiente por 40 minutos) das reações a fim de propiciar a formação de heteroduplexes;
- c) Injeção da amostra no Sistema DHPLC *Wave 4500A/Transgenomics*, a temperaturas calculadas dependendo das condições da sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado;
- d) Análise do padrão de retenção através do software *NaviGator™ Software* e posterior identificação das mutações através de sequenciamento das amostras com padrão diferente dos controles normais.

3.3.5. Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador de 96 capilares de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase™* II DNA Polimerase) GE Healthcare.

Este kit baseia-se no princípio de amplificação como o de uma PCR convencional. Entretanto, são utilizados nucleotídeos marcados com fluorescência que, quando excitados por luz laser, emitem um espectro de luz específico para cada base. Esses nucleotídeos, quando incorporados durante a etapa de extensão das novas fitas de DNA, são terminadores de cadeia, de modo que, ao final da reação, fragmentos de vários tamanhos serão formados cada um com

fluorescência relativa ao último nucleotídeo inserido. Para esta reação de sequenciamento foram utilizados 2µL do produto de PCR, 5pmoles de apenas um dos iniciadores, 4µL da solução *DYEnamic ET reagent premix* e água estéril para um volume final de 10µL. A reação foi distribuída em placa própria para sequenciamento e protegida da luz com papel alumínio.

Em termociclador automático, as amostras foram submetidas por 30 ciclos às seguintes temperaturas e tempos: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento por 15 segundos, extensão a 60°C por 1 minuto. Na tabela 7 estão descritas as temperaturas de anelamento usadas para cada *exon*. Como não é permitido utilizar temperaturas maiores que 60°C, para aqueles *exons* que apresentam temperaturas maiores que esta, a reação de sequenciamento foi realizada com a temperatura de anelamento máxima permitida. O produto da reação de sequenciamento foi submetido à purificação com 1µL de acetato de amônio 7,5M e 27,5µL de álcool etanol absoluto aos 10µL de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, a placa foi centrifugada a 2500g por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foram adicionados 100µL de etanol 70% gelado. Posteriormente a placa foi novamente centrifugada a 2500g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o precipitado. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida a uma rápida centrifugação invertida. Para a eletroforese, adicionou-se 10µL de *MegaBACE loading solution*, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada *well* da placa. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em gelo para, a seguir, serem colocadas no sequenciador para a eletroforese.

O gel para a eletroforese é o *MegaBACE Long Read Matrix* com poliacrilamida linear (LPAAs). As condições de eletroforese foram: voltagem de injeção da amostra 3kV, tempo de injeção da amostra 120 segundos, voltagem de corrida 9kV, tempo de corrida 100 minutos.

As sequências obtidas foram analisadas com a ajuda do programa disponível na Internet, *Chromas Lite*, versão 2.3.3.0 *Chromas MFC application* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Tabela 7: Descrição das temperaturas de anelamento utilizadas para as reações de sequenciamento.

Gene	Localização	Temperatura de anelamento (°C)
<i>ADIPOQ</i>	<i>Exon 1</i>	60
	<i>Exon 2</i>	60
	<i>Exon 3a</i>	58
<i>STATH</i>	<i>Exon 2</i>	60
	<i>Exon 3 e 4</i>	60
	<i>Exon 5</i>	58

3.3.6. Critérios para análise fenotípica

A caracterização fenotípica foi realizada através do preenchimento de um protocolo de avaliação clínico laboratorial desenvolvido em conjunto com o Dr. José Dirceu Ribeiro (Anexo 2). A coleta de dados deste protocolo ocorreu através da pesquisa dos prontuários de atendimento ambulatorial dos pacientes.

A partir de todos os dados coletados foram selecionados aqueles que seriam de maior relevância para a caracterização fenotípica em relação à atividade dos genes modificadores estudados. Os dados selecionados foram: estudo molecular do gene *CFTR*, data de diagnóstico, idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos e data da primeira infecção por *P. aeruginosa*. Foi pesquisado ainda o exame de espirometria, os escores de Shwachman e de Kanga e os valores de saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina.

A data em que o diagnóstico foi realizado nos revela a idade de cada paciente à época, informação relevante, pois se espera que indivíduos mais gravemente afetados tenham sido

diagnosticados mais precocemente do que aqueles que possuem sintomas mais brandos da doença. Dados sobre a idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos, também indicam a gravidade da doença, pois indivíduos mais gravemente afetados geralmente apresentam idade de início dos sintomas mais precocemente. A idade em que a *P. aeruginosa* foi detectada pela primeira vez, pode ser usada para indicar uma suscetibilidade à infecção por essa bactéria, já que a demora na aquisição desse patógeno é clinicamente significativo, pois gera diferenças na sobrevida (Accurso e Sontag, 2003) melhorando o prognóstico.

O exame de espirometria permite avaliar a função respiratória e classificar as insuficiências respiratórias, seguir sua evolução e avaliar a eficácia do tratamento. Um dos parâmetros analisado é o VEF1 que avalia basicamente os distúrbios obstrutivos e gera informações a respeito da gravidade espirométrica da função pulmonar e deste modo permite o agrupamento dos pacientes em classes segundo a gravidade. Além disso, o VEF1 é o melhor parâmetro para analisar a sobrevida. Foram considerados pacientes com obstrução grave aqueles que apresentam VEF1 menor que 40% do previsto, com obstrução moderada valores entre 40-60%, com obstrução leve valores entre 60-80% e apresentando função pulmonar normal valores maiores que 80%. Também foi realizada a média da variação de VEF1 entre os pacientes e classificá-los como possuindo VEF1 acima ou abaixo desse valor.

Além do protocolo de avaliação clínico-laboratorial, também foram realizados dois escores de avaliação clínica: o escore de Shwachman e o escore de Kanga. O escore de Shwachman avalia o estado geral dos pacientes correlacionando a nutrição, atividade geral, exames físicos e achados radiológicos (Anexo 3). Para cada item avaliado é conferida uma pontuação que pode atingir o máximo de 25. Quanto menor a pontuação, e, portanto o escore, pior o quadro clínico (Alvarez, 2002).

O Escore é graduado em excelente (86-100), bom (71-85), médio (56-70), moderado (41-55) e grave (40 ou menos), conforme o número total de pontos. Os escores originais, excelente e bom tornaram-se grau leve, o escore médio passou a ser grau moderado e os escores moderado e grave foram definidos como grave. O escore foi avaliado por profissionais do Ambulatório de Mucoviscidose do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Por se tratar de uma análise muito subjetiva, já que se trata de uma análise clínica, tal escore foi realizado por três examinadores diferentes, para tentar diminuir tal subjetividade.

O escore de Kanga apresenta um enfoque preventivo baseado na avaliação diária de sinais e sintomas apresentados pelos pacientes para detectar a exacerbação pulmonar aguda, que pretende identificar a agudização da doença, prever a melhora ou piora da função respiratória e avaliar os efeitos terapêuticos (Kanga et al., 1999). É definido como um escore simples, de fácil aplicação e baixo custo, que correlaciona dados da rotina dos pacientes com variáveis clínicas comuns e com o VEF1 da espirometria. Inclui sintomas físicos como tosse, produção de secreção, perda de apetite, dispnéia e perda de energia, e clínicos como temperatura, peso, frequência respiratória, chiado e estertoração (Anexo 4). O paciente pode receber de um a cinco pontos em cada critério e a maior pontuação ocorre no indivíduo mais acometido, sendo que pacientes com pontuação maior que 25 são considerados exacerbados.

A saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina reflete a oxigenação do sangue e tem como função avaliar a necessidade de analisar gases sanguíneos e, se indicado, a prescrição de oxigênio suplementar. A partir dos valores obtidos através do exame é possível fazer uma classificação dos pacientes. Indivíduos que apresentem níveis de saturação maiores do que 95% são considerados normais, entre 91-95 como possuindo hipoxemia leve, entre 85-90 hipoxemia moderada e menores que 85% hipoxemia grave. Além disso, a saturação indica a progressão do acometimento da doença pulmonar.

3.3.7. Análise estatística

Através do *software* BIOSTAT v5.0 foi realizado o teste de *Kruskal Wallis* e de T de *student* para avaliar a interação entre os critérios fenotípicos adotados e os polimorfismos referentes ao gene *TNF α* . A fim de evitar resultados falsos-positivos devido ao problema de múltiplos testes, foi utilizada a correção de Bonferroni para ajustar os valores de p nominais de acordo com o número de critérios adotados. Deste modo foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,00652$ para as análises de *Kruskal Wallis* e para o T de *student* $p < 0,0166$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Dentre os 49 indivíduos analisados, a idade variou de um a 26 anos, com média de 9,71 anos e desvio padrão de 6,06 anos. Na distribuição em faixas etárias há 34 pacientes entre zero e 10 anos, 12 entre 11 e 21 e três com mais de 21 anos (Gráfico 1). Foram analisados 25 mulheres e 24 homens, ou seja, houve praticamente um equilíbrio na distribuição segundo o sexo.

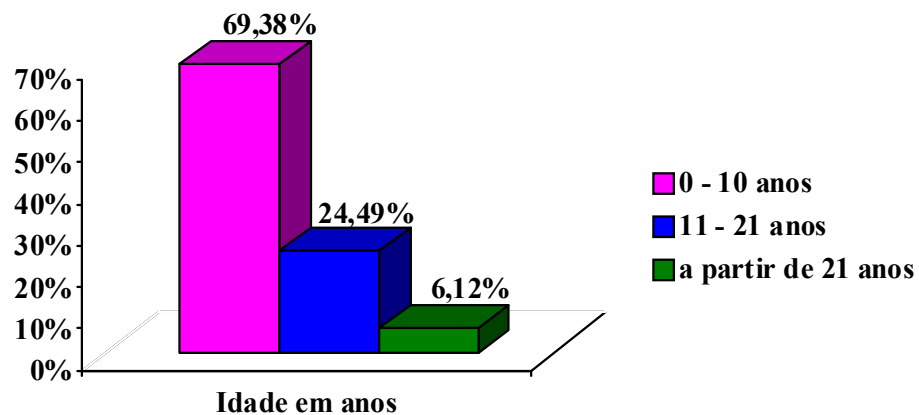


Gráfico 1: Distribuição etária dos pacientes portadores de FC, na amostra avaliada.

Quanto ao genótipo do gene *CFTR*, a maioria dos pacientes analisados é homozigoto para a mutação $\Delta F508$ (63,26%). Essa foi a mutação mais prevalente, encontrada em 79,59% dos alelos, seguida pela G542X (9,18%), R1162X (6,12%), N1303K (3,06%) e R553X (2,04%).

Foram avaliados 49 indivíduos, o genótipo *TNF α* , o genótipo *CFTR*, os escores de Shwachman e Kanga, as classificações de gravidade segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina e VEF1 estão resumidos na tabela 8.

Tabela 8: Caracterização da amostra quanto ao genótipo *TNF α* , genótipo *CFTR*, os escores de Shwachman e Kanga, as classificações de gravidade segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina e VEF1.

Iniciais	Genótipo <i>TNFα</i>		Genótipo <i>CFTR</i>	Escore de Shwachman	Escore de Kanga	Saturação de oxigênio	VEF1
	238	308					
MVG	GG	1/2	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	Normal
JPD	GG	1/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	Leve
RSR	AG	2/2	DF508/DF508	Excelente	Normal	Leve	Normal
EVM	GG	2/2	DF508/R1162X	Excelente	Normal	Leve	Grave
IFM	GG	2/2	DF508/DF508	****	****	****	****
MLA	GG	2/2	DF508/DF508	****	Exarcebado	Normal	Moderado
VLPC	GG	2/2	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	Normal
MAB	GG	2/2	DF508/DF508	Grave	Exarcebado	Leve	Grave
EVSMS	GG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	Leve
YBK	GG	2/2	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	Normal
HB	AG	2/2	DF508/G542X	****	Normal	Grave	Grave
WSP	GG	2/2	DF508/G542X	Médio	Normal	Leve	Grave
DRG	GG	2/2	DF508/DF508	****	****	****	****
BBK	GG	1/2	DF508/N1303K	****	****	****	****
AO	GG	2/2	DF508/DF508	****	Exarcebado	Leve	Leve
LSM	AG	2/2	DF508/DF508	Excelente	Normal	Normal	Moderado
VAL	GG	2/2	DF508/DF508	Bom	Normal	Leve	Leve
LFSA	GG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Leve	Leve
IBN	GG	2/2	DF508/R553X	Excelente	Normal	Normal	Normal
CAQ	GG	1/1	DF508/G542X	****	Normal	Normal	Leve
MEMZ	AG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	Normal
TMG	GG	1/1	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	Normal
JMGR	GG	1/2	DF508/N1303K	****	Normal	Normal	****
MAP	AG	1/1	DF508/DF508	****	****	****	****
AX	GG	2/2	DF508/DF508	Bom	Normal	Normal	Normal
LPOL	GG	1/2	DF508/N1303K	Bom	Normal	Normal	****
EG	GG	2/2	DF508/R1162X	Bom	Normal	Normal	Normal
NCB	GG	1/2	DF508/R553X	****	Normal	Leve	Grave
FVV	GG	2/2	DF508/G542X	Excelente	Normal	Normal	Normal
LSS	GG	2/2	DF508/DF508	****	Exarcebado	Moderada	****
RNC	GG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	****
FEL	GG	2/2	DF508/G542X	Médio	Normal	Normal	Moderado
GOV	GG	1/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	****

Continuação da tabela 8:

CVAR	GG	2/2	DF508/G542X	****	Normal	Normal	****
EAG	GG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Leve	****
AVM	GG	1/1	DF508/G542X	Excelente	Normal	Normal	Normal
BSG	GG	2/2	G542X/R1162X	Bom	Exarcebado	Leve	Leve
GPNS	AG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	****
CAL	GG	2/2	DF508/G542X	Bom	Normal	Normal	Normal
MOS	GG	1/1	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	****
FSC	GG	2/2	DF508/DF508	Bom	Normal	Normal	Normal
ITVS	GG	1/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	Normal
JRL	GG	1/1	DF508/DF508	Leve	Normal	Normal	****
GPT	AG	2/2	DF508/DF508	Excelente	Normal	Normal	Normal
ASR	AG	1/2	DF508/R1162X	****	****	****	****
VAF	GG	2/2	DF508/DF508	****	Normal	Normal	****
IRO	AG	1/1	DF508/DF508	****	Normal	Normal	****
BMSL	GG	2/2	R1162X/R1162X	****	****	****	****
BSC	AG	2/2	DF508/DF508	Médio	Normal	Normal	Leve

Legenda: ****: ausência de resultado

4.2. Caracterização fenotípica

Foram obtidos dados em relação à idade ao diagnóstico de 48 dos 49 pacientes analisados. A idade em que o diagnóstico foi feito distribuiu-se igualitariamente entre as faixas etárias (Tabela 9), e a média da idade em que o diagnóstico foi realizado foi de 29,70 meses (DP=2,47 anos).

Tabela 9: Descrição das idades ao diagnóstico de 48 pacientes.

Idade ao diagnóstico	Número de indivíduos (%)
Até 12 meses	27 (56,25)
De 13 a 36 meses	8 (16,66)
A partir de 36 meses	13 (27,08)
Total	48

Em relação às manifestações clínicas pulmonares e digestivas, foram investigados 47 pacientes sendo que a maioria apresentou alguma manifestação pulmonar e digestiva até os 12

meses de vida, 70,21% e 68,08% respectivamente (Tabela 10). Os dados em relação à idade em que os pacientes tiveram a primeira infecção pela *P. aeruginosa* foram obtidos em 47 dos 49 pacientes selecionados (Tabela 11) e a média de idade foi de 38,11 meses (3,17 anos).

Tabela 10: Descrição das idades de início dos sintomas pulmonares e digestivos.

Idade de início das manifestações pulmonares e digestivas	Manifestações pulmonares – número de indivíduos (%)	Manifestações digestivas - número de indivíduos (%)
Até 12 meses	33 (70,21)	32 (68,08)
De 13 meses a 36 meses	7 (14,89)	4 (8,51)
A partir de 36 meses	5 (10,64)	4 (8,51)
Íleo meconial	-	7 (14,89)
Não apresentam manifestação	2 (4,25)	1 (2,12)
Total	47	47

Tabela 11: Descrição das idades em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa*.

Idade da primeira infecção por <i>P. aeruginosa</i>	Número de indivíduos (%)
Até 12 meses	13 (27,66)
De 13 a 36 meses	14 (29,79)
A partir de 36 meses	15 (31,91)
Não tem a bactéria	5 (10,64)
Total	47

O escore de Kanga demonstrou que entre 44 dos 49 pacientes analisados, 88,64% estava estável no momento da realização deste teste (Tabela 12). O escore de Shwachman foi realizado em 24 indivíduos (Tabela 13). A classificação dos pacientes em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina que foi realizada em 44 dos 49 pacientes analisados encontra-se descrita

Tabela 12: Classificação dos pacientes segundo o escore de Kanga.

Classificação segundo o escore de Kanga	Número de indivíduos (%)
Estável	38 (88,37)
Exacerbação	5 (11,36)
Total	43

Tabela 13: Classificação dos pacientes segundo o escore de Shwachman.

Classificação segundo o escore de Shwachman	Número de indivíduos (%)
Excelente	7 (29,16)
Bom	7 (29,16)
Médio	8 (33,33)
Leve	1 (4,16)
Grave	1 (4,16)
Total	24

Tabela 14: Classificação dos pacientes segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina.

Classificação segundo a saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina	Número de indivíduos (%)
Normal	32 (72,72)
Leve	10 (22,72)
Moderado	1 (2,27)
Grave	1 (2,27)
Total	44

As análises de VEF1 obtidas através do exame de espirometria foram realizadas em 29 pacientes. Observa-se que a maioria dos indivíduos foram classificados como apresentando um fenótipo normal em relação aos valores de VEF1 (51,72%) (Tabela 15).

Tabela 15: Classificação dos pacientes segundo os valores de VEF1.

Classificação segundo o VEF 1	Número de indivíduos (%)
Normal	15 (51,72)
Leve	8 (27,59)
Moderado	3 (10,34)
Grave	3 (10,34)
Total	29

4.3. Análise do gene *TNF α*

4.3.1 Análise do polimorfismo –308G/A

Foram analisados 49 pacientes para o polimorfismo –308G/A do gene *TNF α* . Foram encontrados sete indivíduos homozigotos para o alelo 1 (GG), 33 indivíduos homozigotos para o alelo 2 (AA) e nove indivíduos heterozigotos 1/2 (GA) (Tabela 16), e está em equilíbrio de Hardy-Weinberg com $p=0$ e X^2 : 2,57. A frequência alélica para o G foi de 0,23 e para o A de 0,77 (Tabela 17).

Tabela 16: Prevalência dos genótipos do polimorfismo –308G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada.

Genótipo	Número de indivíduos (%)
1/1 (GG)	7 (14,28)
2/2 (AA)	33 (67,35)
1/2 (GA)	9 (18,36)
Total	49

Tabela 17: Prevalência dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada.

Alelos	Número de indivíduos (%)
1 (G)	23 (0,23)
2 (A)	75 (0,77)
Total	98

A distribuição dos genótipos e dos alelos encontrados referentes ao polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* em relação à idade em que o diagnóstico foi realizado encontram-se descritas nas tabelas 18 e 19 respectivamente. Também foi realizada a correlação entre os genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média de idade em que o diagnóstico foi realizado (Tabela 20)

Tabela18: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Idade ao diagnóstico					
Até 12 meses	5	3	19	0,1105	0,884
De 13 a 36 meses	1	3	4		
A partir de 36 meses	1	3	9		
Total	48				

Tabela 19: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Idade ao diagnóstico	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	13	41	0,1212	0,9696
De 13 a 36 meses	5	11		
A partir de 36 meses	5	21		
Total	96			

Tabela 20: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média de idade em que o diagnóstico foi realizado apresentado em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade em que o diagnóstico foi realizado (meses)	Desvio padrão (meses)	Comparações e T student (p)
1/1 (GG)	7 (15,90)	12,71	13,04	(1/1 X 1/2) 1,0
1/2 (GA)	8 (18,18)	39,75	66,42	(1/1 X 2/2) 1,0
2/2 (AA)	29 (65,90)	31,03	33,97	(1/2 X 2/2) 0,0309
Total	44			

A relação entre a distribuição genotípica do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e a idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos estão descritos nas tabelas 21 e 22, respectivamente. A distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e a idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos estão descritos nas tabelas 23 e 24, respectivamente. O íleo meconial ocorreu em oito dos 47 pacientes analisados, destes, seis indivíduos são portadores do genótipo 2/2, um indivíduo é portador do genótipo 1/1 e o outro é heterozigoto para esse polimorfismo. Também

foi realizada a correlação entre os genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média de idade de início dos sintomas pulmonares (Tabela 25) e digestivos (Tabela 26).

Tabela 21: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Idade de início sintomas pulmonares	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	<i>Kruskall</i> <i>Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Até 12 meses	4	8	22	0,1084	0,8672
De 13 a 36 meses	3	1	3		
A partir de 36 meses	0	0	5		
Não tem	0	0	1		
Total	47				

Tabela 22: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Idade de início sintomas digestivos	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	<i>Kruskall</i> <i>Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Até 12 meses	3	7	21	0,0505	0,404
De 13 a 36 meses	1	0	3		
A partir de 36 meses	1	0	3		
Total	39				

Tabela 23: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Idade de início dos sintomas pulmonares	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	16	52	0,3094	1,0
De 13 a 36 meses	7	7		
A partir de 36 meses	0	10		
Não tem	0	2		
Total	94			

Tabela 24: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Idade de início dos sintomas digestivos	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	13	49	0,2612	1,0
De 13 a 36 meses	2	6		
A partir de 36 meses	2	6		
Total	94			

Tabela 25: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo a média de idade de início dos sintomas pulmonares apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade de início dos sintomas pulmonares (meses)	Desvio Padrão (meses)	Comparações e T <i>student</i> (p)
1/1 (GG)	7 (17,07)	9,28	15,14	(1/1 X 1/2) 1,0
1/2 (GA)	8 (19,51)	31,85	62,68	(1/1 X 2/2) 1,0
2/2 (AA)	26 (63,41)	18,30	36,96	(1/2 X 2/2) 0,226
Total	41			

Tabela 26: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo a média de idade de início dos sintomas digestivos apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade de início dos sintomas digestivos (meses)	Desvio padrão (meses)	T <i>student</i> p
1/1 (GG)	3 (11,11)	4,33	1,52	(1/1 X 1/2) 1,0
1/2 (GA)	4 (14,81)	23,25	25,07	(1/1 X 2/2) 1,0
2/2 (AA)	20 (74,07)	18,9	28,54	(1/2 X 2/2) 1,0
Total	27			

Foi avaliada a relação dos genótipos e dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e a da idade em que a bactéria *P. aeruginosa* foi detectada pela primeira vez (Tabela 27 e 28).

Tabela 27: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e a idade em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa*, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Idade primeira infecção	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	<i>Kruskall Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Até 12 meses	7	7	1	0,1607	1,0
De 13 a 36 meses	0	2	11		
A partir de 36 meses	0	0	14		
Não tem	0	0	5		
Total	47				

Tabela 28: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* e a idade em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa*, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Idade primeira infecção	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	21	9	0,0833	0,6684
De 13 a 36 meses	2	24		
A partir de 36 meses	0	28		
Não tem	0	10		
Total	94			

Foi realizada a distribuição dos genótipos e dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através dos valores de VEF1 (Tabela 29 e 30). Também foi realizada a correlação entre o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos valores de VEF1 apresentados em cada genótipo (Tabela 31).

Tabela 29: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Classificação VEF1	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>80%)	2	2	11	0,0223	0,1784
Leve (60-80%)	1	1	6		
Moderado (40-60%)	0	0	3		
Grave (<40%)	0	1	4		
Total	31				

Tabela 30: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Classificação VEF1	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>80%)	6	24	0,0294	0,2352
Leve (60-80%)	3	13		
Moderado (40-60%)	0	6		
Grave (<40%)	0	9		
Total	62			

Tabela 31: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos valores de VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	Número de indivíduos (%)	Média de VEF1 (%)	Desvio padrão	Comparações e T student (p)
1/1 (GG)	3 (9,68)	85	13,45	(1/1 X 1/2) 1,0
1/2 (GA)	4 (12,90)	82	48,39	(1/1 X 2/2) 1,0
2/2 (AA)	24 (77,42)	71	27,10	(1/2 X 2/2) 0,2526
Total	31			

Foi realizada a distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman na amostra avaliada (Tabela 32 e 33). Também foi realizada a correlação entre o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos pontos obtidos no escore apresentados em cada genótipo (Tabela 34).

Tabela 32: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Escore de Shwachman	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	<i>Kruskall</i> <i>Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Excelente (100-86)	2	2	3	0,4461	1,0
Bom (71-85)	2	1	4		
Leve (56-70)	1	0	0		
Médio (41-55)	0	4	4		
Grave (<=40)	0	0	1		
Total	24				

Tabela 33: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Escore de Shwachman	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Excelente (100-86)	6	8	0,2087	1,0
Bom (71-85)	5	9		
Leve (56-70)	2	0		
Médio (41-55)	0	12		
Grave (<=40)	0	2		
Total	48			

Tabela 34: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com os pontos obtidos no escore Shwachmann, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A	Número de indivíduos (%)	Média do escore Shwachman	Desvio padrão	Comparações e T student (p)
1/1 (GG)	4 (16,16)	74	11,81	(1/1 X 1/2) 1,0
½ (GA)	4 (16,16)	62	14,14	(1/1 X 2/2) 1,0
2/2 (AA)	16 (66,66)	81	15,62	(1/2 X 2/2) 1,0
Total	24			

A classificação segundo o escore de Kanga e os genótipos e alelos referentes ao polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada encontra-se na tabela 35 e tabela 36 respectivamente. Realizou-se a classificação da gravidade utilizando-se os valores de saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina e correlacionou-se com os genótipos e alelos do polimorfismo -308 G/A do gene *TNF α* (Tabela 37 e 38).

Tabela 35: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Escore de Kanga	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	X ²	p
Exacerbado	0	2	3	2,82	0,24
Normal	6	5	27		
Total	43				

Tabela 36: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Escore de Shwachman	1 (G)	2 (A)	Fisher	Fisher corrigido
Exacerbado	2	8	1	1,0
Normal	17	59		
Total	86			

Tabela 37: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.

Genótipo -308G/A Saturação	1/1 (GG)	1/2 (GA)	2/2 (AA)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>95%)	6	6	19	0,1565	1,0
Leve (91-95%)	0	1	9		
Moderada (85-90%)	0	0	1		
Grave (<85%)	0	0	1		
Total	43				

Tabela 38: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Saturação	1 (G)	2 (A)	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>95%)	18	44	0,0814	0,1628
Leve (91-95%)	1	19		
Moderada (85-90%)	0	2		
Grave (<85%)	0	2		
Total	86			

4.3.2. Análise do polimorfismo -238G/A

Foram analisados 49 pacientes para o polimorfismo -238G/A. Foram encontrados 39 indivíduos homozigotos GG e 10 indivíduos heterozigotos G/A. Não foram encontrados indivíduos homozigotos AA (Tabela 39, e está equilíbrio de Hardy-Weinberg com $p=1,0$ e $X^2=2,0$. A frequência alélica para o G foi de 0,90 e para o A de 0,10 (Tabela 40).

Tabela 39: Prevalência dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada.

Genótipo	Número de indivíduos (%)
G/G	39 (79,59)
A/A	0
G/A	10 (20,41)
Total	49

Tabela 40: Prevalência dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada.

Alelos	Número de indivíduos (%)
G	88 (0,90)
A	10 (0,10)
Total	98

A distribuição dos genótipos e alelos encontrados referentes ao polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* em relação à idade em que o diagnóstico foi realizado encontra-se descritos nas tabelas 41 e 42. Também foi realizada a distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* e a média do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* (Tabela 43).

Tabela 41: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Idade de diagnóstico	AG	GG	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	4	23	0,065	0,52
De 13 a 36 meses	4	4		
A partir de 36 meses	2	11		
Total	48			

Tabela 42: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade em que o diagnóstico foi realizado, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Idade ao diagnóstico	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	50	4	0,0463	0,3704
De 13 a 36 meses	12	4		
A partir de 36 meses	24	2		
Total	96			

Tabela 43: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a média de idade em que o diagnóstico foi realizado apresentado em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade em que o diagnóstico foi realizado (meses)	Desvio padrão (meses)	T <i>student</i> (p)
GG	34 (77,27)	30,23	40,11	1,0
GA	10 (22,72)	27,09	39,39	
Total	44			

Também foi realizada a relação entre a idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos e o polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* . Os resultados estão descritos nas tabelas 44 e 45, respectivamente. A distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* e a idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos estão descritos nas tabelas 46 e 47, respectivamente. O íleo meconial ocorreu em sete dos 47 pacientes analisados e todos possuem o genótipo GG. Também foi realizada a correlação entre os genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a média de idade de início dos sintomas pulmonares (Tabela 48) e digestivos (Tabela 49).

Tabela 44: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Idade de início dos sintomas pulmonares	AG	GG	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	6	26	0,1175	0,94
De 13 a 36 meses	2	5		
A partir de 36 meses	2	4		
Não tem	0	2		
Total	47			

Tabela 45: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Idade de início dos sintomas digestivos	AG	GG	<i>Kruskall</i> <i>Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Até 12 meses	7	24	0,1719	1,0
De 13 a 36 meses	2	2		
A partir de 36 meses	0	4		
Não tem	0	1		
Total	47			

Tabela 48: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas pulmonares, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Idade de início sintomas pulmonares	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	58	6	0,0421	0,3368
De 13 a 36 meses	12	2		
A partir de 36 meses	10	2		
Não tem	4	0		
Total	94			

Tabela 47: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a idade de início dos sintomas digestivos, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Idade de início dos sintomas digestivos	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	55	7	0,1102	0,8816
De 13 a 36 meses	6	2		
A partir de 36 meses	8	0		
Não tem	2	0		
Total	94			

Tabela 48: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene $TNF\alpha$ de acordo a média de idade de início dos sintomas pulmonares apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade de início dos sintomas pulmonares (meses)	Desvio Padrão (meses)	T <i>student</i> (p)
GG	32 (78,04(	22,22	44,31	1,0
GA	9 (21,95)	13	18,43	
Total	41			

Tabela 49: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene $TNF\alpha$ de acordo a média de idade de início dos sintomas digestivos apresentados em cada genótipo, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	Número de indivíduos (%)	Média de idade de início dos sintomas digestivos (meses)	Desvio Padrão (meses)	T <i>student</i> p
GG	20 (74,04)	22,45	29,39	0,1264
GA	17 (62,96)	5	3,31	
Total	27			

Foi avaliada a relação da distribuição genotípica e alélica do polimorfismo -238G/A do gene $TNF\alpha$ e a da idade em que a bactéria *P. aeruginosa* foi detectada pela primeira vez (Tabela 50 e 51).

Tabela 50: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* e a idade em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa* em meses, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Idade da primeira infecção	AG	GG	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	4	11	0,0180	0,144
De 13 a 36 meses	3	11		
A partir de 36 meses	2	11		
Não tem	0	5		
Total	47			

Tabela 51: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* e a idade em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa*, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Idade da primeira infecção	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Até 12 meses	26	4	0,0209	0,1672
De 13 a 36 meses	25	3		
A partir de 36 meses	24	2		
Não tem	10	0		
Total	94			

Foi realizada a distribuição dos genótipos e dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através dos valores de VEF1 (Tabela 52 e 53). Também foi realizada a correlação entre o polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos valores de VEF1 apresentados em cada genótipo (Tabela 54).

Tabela 52: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	AG	GG	<i>Kruskall Wallis</i>	<i>Kruskall Wallis</i> corrigido
Classificação VEF1				
Normal (>80%)	3	12	0,0384	0,3072
Leve (60-80%)	1	6		
Moderado (40-60%)	1	2		
Grave (<40%)	1	4		
Total	31			

Tabela 53: Distribuição dos alelos do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação obtida através do VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Classificação VEF1	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>80%)	27	3	0,0180	0,144
Leve (60-80%)	13	1		
Moderado (40-60%)	5	1		
Grave (<40%)	9	1		
Total	62			

Tabela 54: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos valores de VEF1 previsto, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	Número de indivíduos (%)	Média de VEF1 (%)	Desvio padrão	T de <i>student</i>
AG	6 (19,35)	75	33,97	0,4973
GG	25 (80,64)	73	28,39	
Total	31			

Foi feita a relação da classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman com os genótipos e alelos do polimorfismo -238/A do gene *TNF α* , na amostra avaliada (Tabela 55 e 56). Também foi feita a correlação entre o polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a média dos pontos obtidos no escore apresentados em cada genótipo (Tabela 57).

Tabela 55: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Escore de Shwachman	AG	GG	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Excelente (100-86)	4	3	0,6684	1,0
Bom (71-85)	1	6		
Leve (56-70)	0	1		
Médio (41-55)	4	4		
Grave (<=40)	1	0		
Total	24			

Tabela 56: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com a classificação de gravidade obtida através do escore de Shwachman, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Escore de Shwachman	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Excelente (100-86)	10	4	0,1161	0,8928
Bom (71-85)	13	1		
Leve (56-70)	2	0		
Médio (41-55)	12	4		
Grave (<=40)	1	1		
Total	48			

Tabela 57: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com os pontos obtidos no escore Shwachmann, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A	Número de indivíduos (%)	Média do escore Shwachman	Desvio padrão	T <i>student</i>
AG	4	85	12,90	1,0
GG	20	74	13,38	
Total	24			

A classificação segundo o escore de Kanga e os genótipos e alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada, encontram-se na tabela 58 e 59. Realizou-se a classificação da gravidade utilizando-se os valores de saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina e os genótipos e alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* (Tabela 60 e 61).

Tabela 58: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Escore de Kanga	AG	GG	Teste exato de Fisher p
Exarcebado	2	3	0,28
Normal	7	31	
Total	43		

Tabela 59: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* de acordo com o escore de Kanga, na amostra avaliada.

Alelos -308G/A Escore de Kanga	G	A	Fisher	Fisher corrigido
Exacerbado	8	2	0,2794	1,0
Normal	69	7		
Total	86			

Tabela 60: Distribuição dos genótipos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.

Genótipo -238G/A Saturação	AG	GG	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>95%)	9	22	0,1804	1,0
Leve (91-95%)	1	9		
Moderada (85-90%)	0	1		
Grave (<85%)	0	1		
Total	43			

Tabela 61: Distribuição dos alelos do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* em relação à saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina, na amostra avaliada.

Alelos -238G/A Saturação	G	A	Kruskall Wallis	Kruskall Wallis corrigido
Normal (>95%)	53	9	0,0814	0,6512
Leve (91-95%)	19	1		
Moderada (85-90%)	2	0		
Grave (<85%)	2	0		
Total	86			

4.4. DHPLC e Sequenciamento

Os genes *ADIPOQ* e *STATH* foram analisados por DHPLC e por sequenciamento automático.

4.4.1 *ADIPOQ*

Foram analisados os três *exons* do gene *ADIPOQ*. Os *exons* 1 e 2 apresentaram muitos padrões cromatográficos, tanto em indivíduos normais (controles), como nos pacientes. Deste modo, optou-se pelo sequenciamento de todo o gene para os pacientes sem que fosse realizada a triagem de mutações por DHPLC (Figuras 13 e 14).

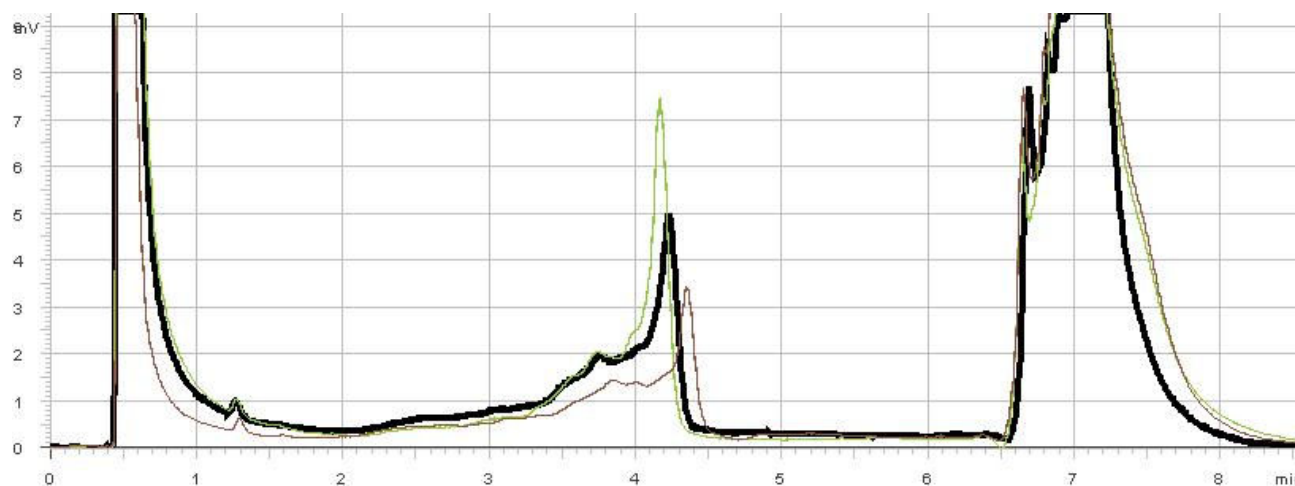
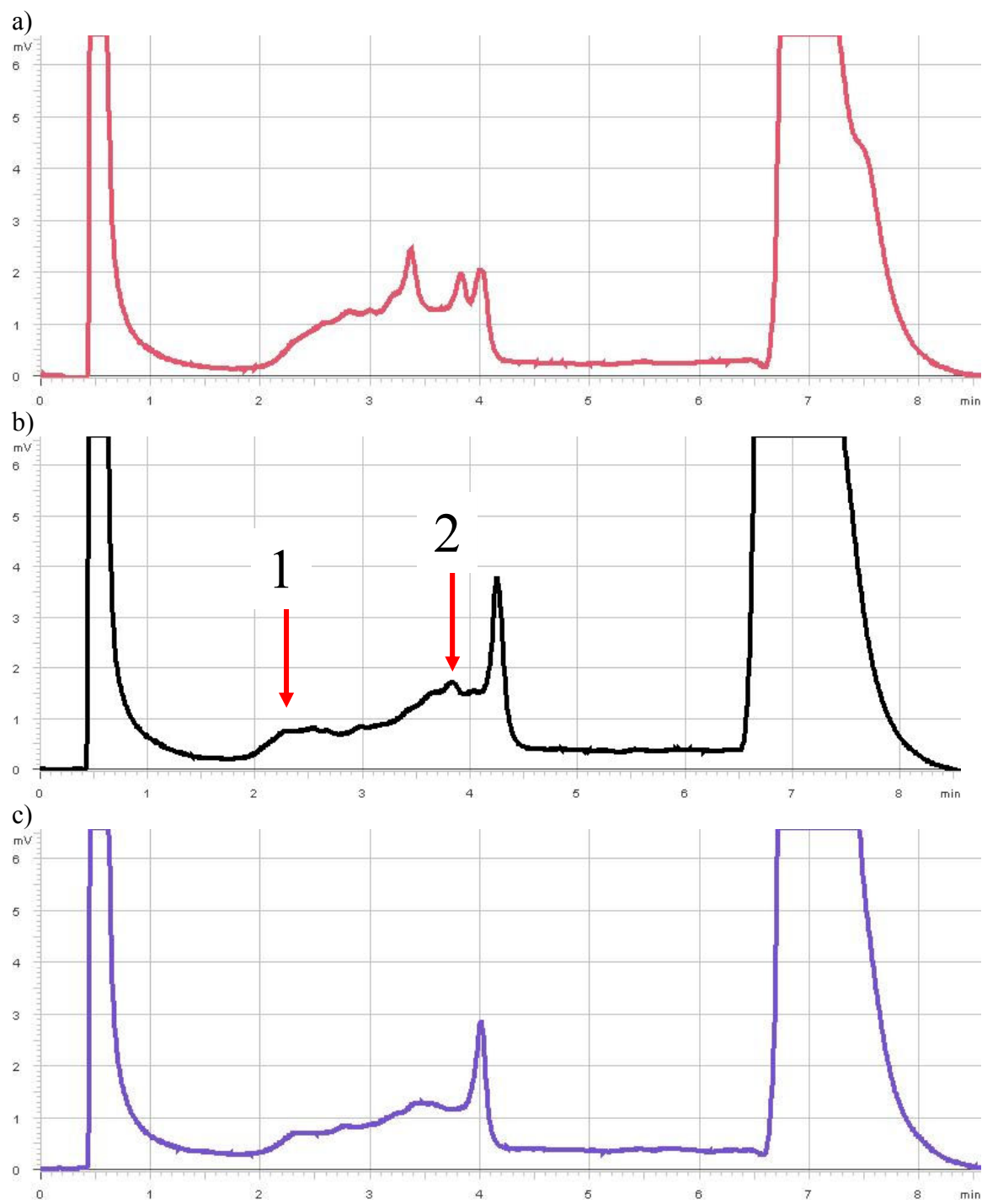


Figura 13: Cromatograma da análise em DHPLC de três indivíduos controle para o *exon* 1 do gene *ADIPOQ*.



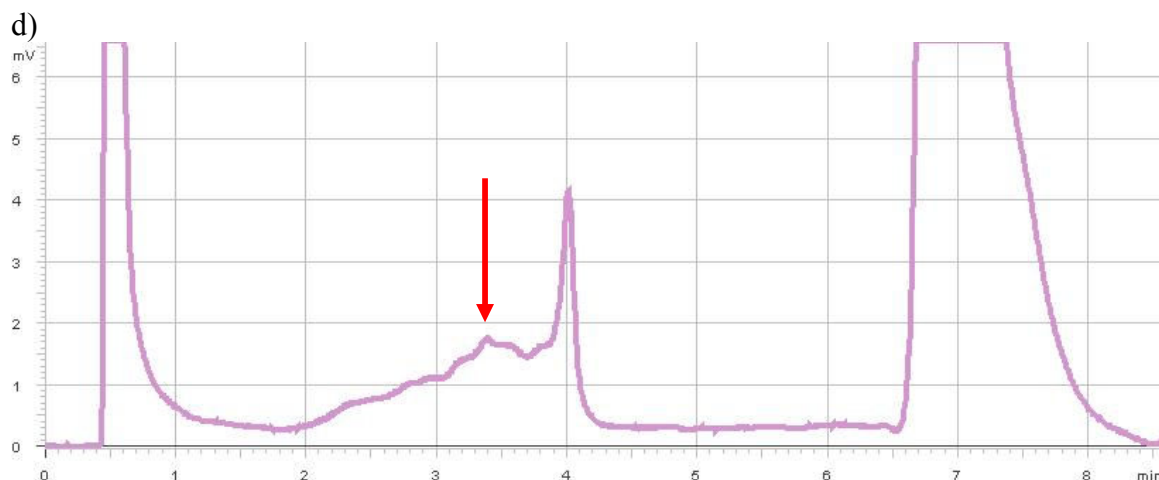


Figura 14: Cromatograma da análise em DHPLC de três pacientes para o *exon 2* do gene *ADIPOQ*. O item (a) possui um padrão totalmente diferente dos demais. No item (a) da figura é evidenciada pela seta 1 uma maior dilatação do início da injeção, já a seta 2 demonstra um estreitamento que se sobressai próximo ao do pico de injeção. O item (c) possui um padrão homogêneo e no item (d), evidenciado pela seta vê-se uma proeminência da curva.

Com relação ao sequenciamento automático, para o *exon 1* do gene *ADIPOQ*, foram analisados 45 indivíduos e todos apresentaram a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como padrão. No *exon 2* foi realizado o sequenciamento de 5 indivíduos sendo que estes apresentaram a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como padrão.

O *exon 3* por apresentar 825 pares de bases foi dividido em duas partes, pois se trata de um fragmento grande de 825pb. Não foi possível analisar a primeira parte do *exon*, pois os picos de análise obtidos após a injeção no equipamento estavam sempre abaixo do limiar recomendado (3mV), apesar de todas as modificações feitas para melhorar a qualidade da PCR (Figura 15) para a injeção (Figura 16). Já para a segunda parte do *exon*, a análise em DHPLC não pôde ser realizada, pois não foi obtida uma PCR de boa qualidade para aplicação no equipamento.

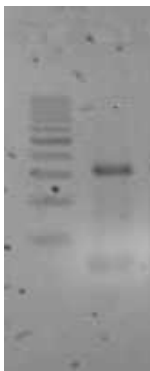
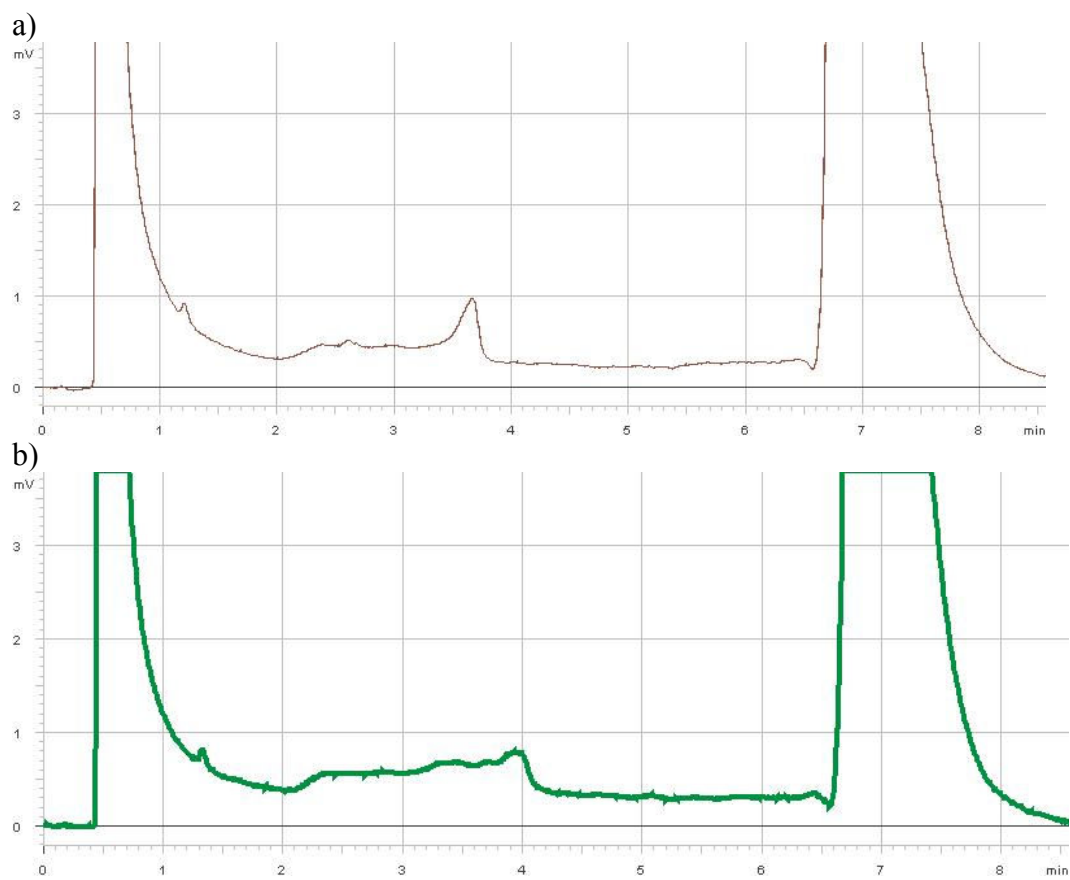


Figura 15: Eletroforese de gel de agarose 1,5%: na coluna 1 marcador de peso molecular de 100pb; na coluna 2 PCR para o *exon 3a* do gene *ADIPOQ*.



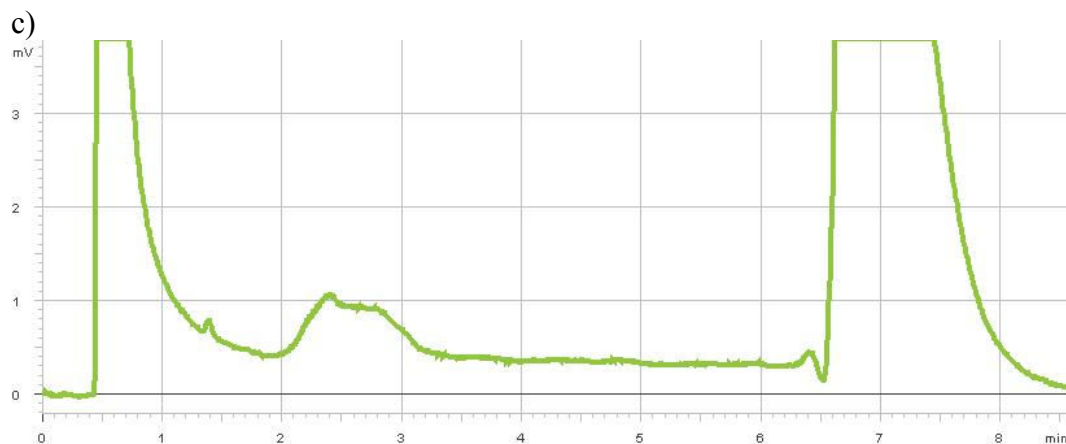


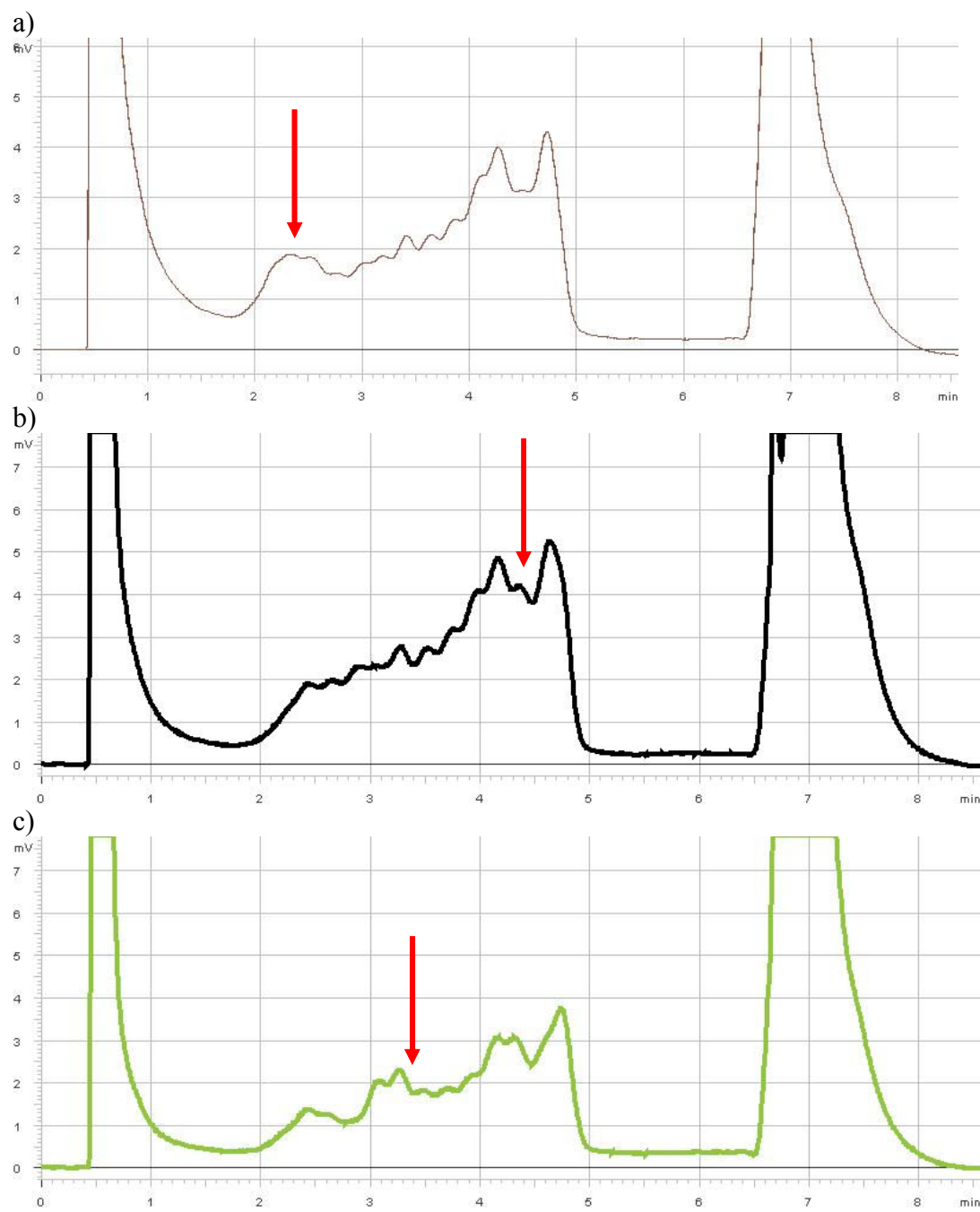
Figura 16: Cromatograma da análise em DHPLC de um paciente para o *exon 3a* do gene *ADIPOQ*.

Na primeira parte do *exon 3* foi analisado somente um paciente por sequenciamento que apresentou a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como padrão. Não foi realizado o sequenciamento da segunda parte do *exon 3*, por problemas metodológicos.

4.4.2 *STATH*

Foram analisados quatro dos cinco *exons* do gene *STATH*. Optou-se por não analisar o *exon 1* porque este possui uma sequência que é codificada, mas não é traduzida. Como os *exons* três e quatro são pequenos, foi desenhado um único par de iniciador para a análise destes. Assim como no gene *ADIPOQ*, a análise em DHPLC dos *exons 2, 3 e 4* não pode ser realizada, porque esses *exons* apresentaram diferentes padrões cromatográficos nos quatro indivíduos controles selecionados. Deste modo, optou-se pelo sequenciamento de todo o gene para os pacientes sem que fosse realizada a triagem por DHPLC (Figura 17).

O sequenciamento do em relação ao *exon 2* gene *STATH*, foram analisados 49 indivíduos e todos apresentam a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como sequência padrão. Nos *exons 3 e 4* foram sequenciados seis indivíduos que apresentam a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como sequência padrão.



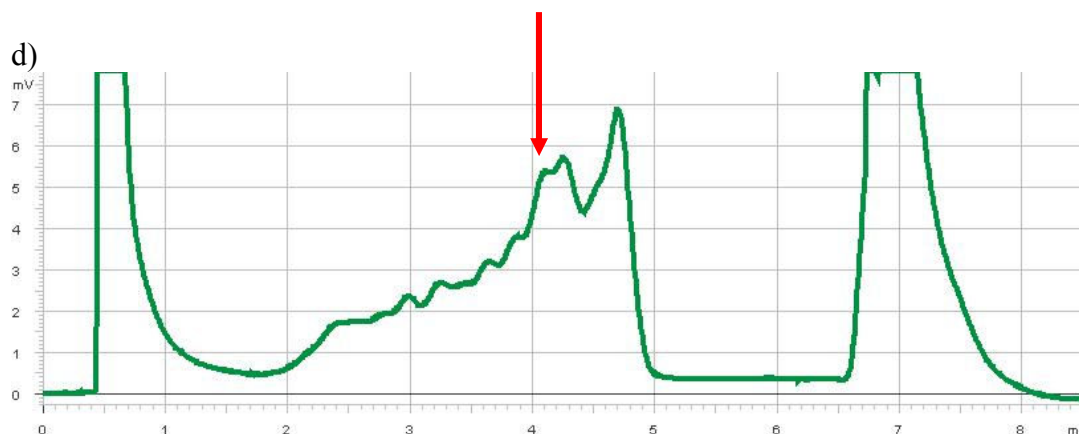


Figura 17: Cromatograma da análise em *STATH* dos quatro controles selecionados para os *exon* 3 e

4. O item (a) em relação ao item (b) possui uma dilatação logo após o começo da análise, evidenciada pela seta que não é encontrada no item (b). Já o item (b) possui mais reentrâncias no pico de análise do que o item (a). Na comparação entre o item (c) e (d), o item (c) possui mais reentrâncias do que o (d), evidenciado pela seta, e o item (d) possui uma das partes do pico mais baixa do que a encontrada em (c).

Somente no *exon* 5 foi possível a realização da triagem de mutações pelo DHPLC. Foram encontrados quatro padrões diferentes e os pacientes foram agrupados de acordo com o padrão com qual se identificavam (Tabela 62) (Figura 18).

Tabela 62: Caracterização da amostra em relação ao perfil cromatográfico obtido por meio da análise no DHPLC para o *exon 5* do gene *STATH*.

Paciente	Perfil Cromatográfico
MVG	Padrão 2
JPD	Padrão 4
RSR	Padrão P
EVM	Padrão P
IFM	Padrão P
TAB	Padrão 2
MLA	Padrão alterado
VLPC	Padrão 3
MAB	Padrão alterado
EVSMS	Padrão 4
YBK	Padrão 4
HB	Padrão 4
RGJ	Padrão 4
WSP	Padrão 4
DRG	Padrão 4
BBK	Padrão alterado
AO	Padrão 3
LSM	Padrão 1
SJV	Padrão 1
VAL	Padrão alterado
LFS	Padrão alterado
IBN	Padrão alterado
CAQ	Padrão alterado
MEMZ	Padrão 2
TMG	Padrão alterado
JMGR	Padrão 3
MAP	Padrão 2
FVR	Padrão 2

Paciente	Perfil Cromatográfico
AX	Padrão alterado
LPOL	Padrão 2
EG	Padrão alterado
NCB	Padrão 4
MBJ	Padrão alterado
LSS	Padrão 4
RNC	Padrão 3
FEL	Padrão 4
GOV	Padrão 3
CVAR	Padrão 3
EAG	Padrão alterado
AVM	Padrão 1
GPNS	Padrão alterado
CAL	Padrão 1
MOS	Padrão 4
FSC	Padrão 1
ITVS	Padrão 3
JRL	Padrão alterado
GPT	Padrão alterado
ASR	Padrão alterado
VAF	Padrão alterado
IRO	Padrão 4
BMSL	Padrão 2
BSC	Padrão 1
CAACC	Padrão 1
MPC	Padrão 2
B	Padrão 2
LGA	Padrão 1

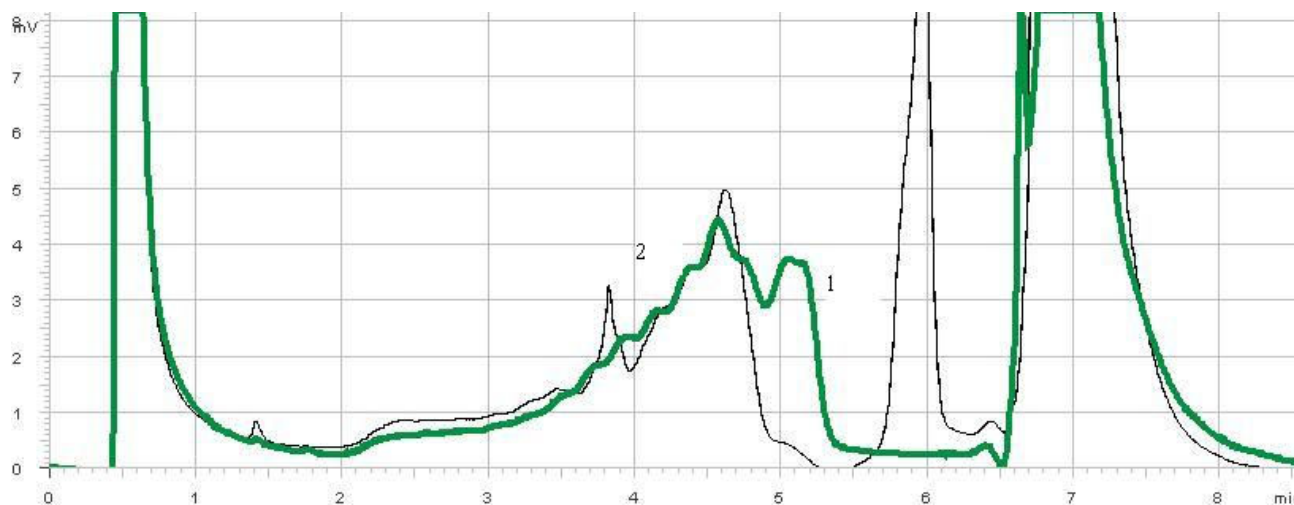


Figura 18: Cromatograma da análise em DHPLC do *exon 5* do gene *STATH*: pico 1, indivíduo controle normal, pico 2, indivíduo que apresenta padrão diferente do normal o que sugere presença de alteração que deve ser confirmada através do sequenciamento da região.

Em relação ao sequenciamento do *exon 5* do gene *STATH*, foi sequenciado um indivíduo de cada padrão apresentado na análise de DHPLC e os pacientes que apresentaram um padrão alterado em comparação aos padrões apresentados pelos controles. Assim, foram selecionados para sequenciamento 25 indivíduos do total de 49 analisados no DHPLC. Destes, o sequenciamento foi realizado em 17, os quais apresentam a mesma sequência no *exon* e nas junções *exon/ intron*, daquela utilizada como padrão. Nos demais indivíduos selecionados não foi possível realizar o sequenciamento por problemas técnicos, são eles: três indivíduos que apresentaram padrão alterado quando analisados no DHPLC, um indivíduo representativo do padrão 3, um indivíduo representativo do padrão 1 e um indivíduo cuja análise não pôde ser realizada no DHPLC por problemas técnicos.

5. Discussão

A dificuldade em se estabelecer uma relação entre o genótipo e o fenótipo da FC é uma característica clara. Assim, a baixa correlação entre genótipo e gravidade da doença na FC tem levado à procura de outro gene ou grupo de genes, que possam explicar essas variações fenotípicas.

5.1. Caracterização da amostra

Quanto à distribuição da idade houve um predomínio de uma população mais jovem, com uma média de idade de 9,71 anos e um desvio padrão de 6,06 anos. Quando foi realizada uma distribuição por faixas etárias, percebe-se que a maioria dos indivíduos possui entre zero e dez anos (69,38%), enquanto que apenas 30,61% possuem mais de 10 anos de idade. Este fato ocorre devido ao prognóstico ruim da doença, com muitos pacientes falecendo precocemente. Todavia, a sobrevida e o prognóstico desses pacientes têm melhorado nas últimas décadas. Um dos fatores que tem sido apontado como responsável por esse fato é o atendimento sistematizado dos pacientes em centros especializados em FC, como é o caso descrito por Collins et al. (1999). Na década de 30, quando a doença foi descrita, 80% das crianças morriam no primeiro ano de vida. Em 1980, a sobrevida aumentou para 20 anos, chegando a 28 na década de 90 e em 2001 alcançava os 32 anos (Santana et al., 2003).

Com relação ao sexo, foi observada uma distribuição uniforme, com 51,02% de mulheres e 48,98% de homens, como era esperado para uma doença autossômica. Entretanto a literatura descreve um discreto predomínio do sexo masculino em relação ao sexo feminino. Este predomínio também foi encontrado por Streit et al. (2003) em seu estudo realizado em Porto Alegre onde estes autores encontraram o sexo masculino com uma frequência de 61% para 39% nas mulheres. Marostica et al. (1998) em seu estudo realizado no Rio Grande do Sul, também descreveram o sexo masculino (62,3%) com uma prevalência maior do que o feminino (37,7%). Este predomínio deve

ocorrer, pois as mulheres são mais gravemente afetadas por algumas das características da FC, como ocorrência de diabetes, e assim apresentar uma sobrevida diminuída em relação aos homens.

A média da idade em que o diagnóstico foi feito (2,47 anos) é maior do que a encontrada por Dorfman et al. (2008) que foi de 0,36 anos em um grupo de 611 pacientes homozigotos $\Delta F508$. Já para a média de idade em que houve a primeira infecção por *P. aeruginosa* em nossa amostra (3,17 anos) foi menor do que a descrita por Dorfman et al. (2008) que é de 7,5 anos. Essa diferença talvez possa ser explicada pela idade de diagnóstico do grupo de Dorfman et al. (2008) ser menor do que a da amostra avaliada, sugerindo que o tratamento daqueles pacientes começou antes do que os da amostra avaliada, o que pode ter retardado o aparecimento da bactéria.

5.2. Análise do gene *TNF α*

5.2.1. Análise do polimorfismo -308G/A

Dos 49 indivíduos estudados para esse polimorfismo, 14,28% são portadores do alelo 1 (G) em homozigose, 67,35 possuem o alelo 2 (A) em homozigose e 18,36 são heterozigotos. As frequências alélicas encontradas foram de 0,77 e 0,23 para o alelo A e G respectivamente, contrárias ao que é relatado pela literatura. Schmitt-Grohé et al. (2006) em seu estudo com 53 indivíduos com FC realizado na Alemanha, encontraram o alelo G como sendo o mais comum com uma frequência alélica de 0,7 e o alelo A de 0,3. Arkwright et al., 2003, também obtiveram resultados semelhantes, com o alelo G com frequência de 0,75 e o A 0,25 em seu estudo realizado no Reino Unido com 261 indivíduos. Tais dados também foram obtidos por Hull e Thompson (1998), com frequências alélicas para o G e A de 0,81 e 0,19, respectivamente, com 53 pacientes estudados provenientes do Reino Unido, e como só encontraram um indivíduo homozigoto para o alelo 2, este foi incluído no grupo de heterozigotos. Essa variação talvez possa ser explicada pela grande miscigenação presente em nossa população somada ao tipo de colonização ocorrida no país.

A utilização da idade em que o diagnóstico foi realizado e idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos não mostraram diferenças significativas. Era esperado que as idades de diagnóstico e de início dos sintomas ocorressem na maioria dos pacientes até o primeiro ano de vida, o que denotaria um pior prognóstico e apresentação mais severa da doença, e que esses pacientes fossem portadores do alelo 2 em sua maioria, já que este alelo foi descrito como associado a uma doença pulmonar mais severa (Hull e Thompson, 1998). Esse fato era esperado pois se trata de um grupo de pacientes que possuem mutações de classe I e ou II, ou seja que têm um prognóstico pior. Portanto, a idade de início dos sintomas e de diagnóstico deveria ser precoce.

Com relação à idade em que a bactéria *P. aeruginosa* foi detectada pela primeira vez, não foi encontrado um valor significativo na amostra avaliada, o que indica que não deve haver influência do genótipo -308G/A do gene *TNF α* , na infecção por essa bactéria. Este dado está de acordo com o que foi descrito por Arkwright et al. (2003) e Yarden et al. (2005) em seu estudo com 180 indivíduos homozigotos $\Delta F508$ provenientes da Bélgica e República Tcheca. Como era esperado que a maioria dos pacientes tivesse um diagnóstico precoce, esperava-se que a idade da primeira infecção pela bactéria fosse tardia, já que com o tratamento começando precocemente a infecção seria retardada. Mas, não foi o que aconteceu. Houve uma distribuição homogênea entre as faixas etárias provavelmente porque o tratamento tem sido eficiente. É sabido que quanto mais precoce for a infecção pela *P. aeruginosa* mais rápido acontecerá o declínio da função pulmonar. Possivelmente os pacientes que apresentam uma idade tardia de infecção são aqueles que tiveram o diagnóstico precoce.

Na classificação de gravidade da doença pulmonar pelo VEF1, 74,19% dos indivíduos analisados foram classificados como apresentando fenótipo pulmonar normal e leve, ao contrário do que era esperado, baseado no princípio de que o alelo 2 do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* , possa ter relação com uma apresentação clínica mais severa da doença e, a maioria (73,91%) dos

pacientes que foram classificados como apresentando fenótipo normal possuem o alelo 2 em homozigose. Não foi possível estabelecer uma relação estatisticamente significativa com o polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* . Quando foi realizada a comparação entre as médias de VEF1 nos genótipo -308G/A do gene *TNF α* não foi encontrado valor de p significativo. Hull e Thompson (1998) demonstraram que a média de VEF1 no grupo de pacientes com o genótipo 1/2 era significativamente mais baixa do que a apresentada no grupo 1/1, o que reforça a hipótese desses autores de que o alelo 2 esteja associado com uma doença pulmonar mais grave. Já Schmitt-Grohé et al. (2006) não detectaram diferenças significativas entre a média de VEF1 no genótipo -308G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada. Yarden et al. (2005) também não encontraram diferenças significativas entre a média de VEF1 nos genótipos do gene *TNF α* na amostra, com um $p=0,15$.

Quando foi realizada a distribuição dos genótipos do gene *TNF α* na amostra em relação à classificação obtida pelo escore de Shwachman não foi observada diferença significativa. Quando foi realizada a média dos pontos obtidos pelo escore observou-se que não foi encontrado valor de p significativo. Schmitt-Grohé et al. (2006) e Hull e Thompson (1998) ($p=0,17$) também não detectaram diferenças significativas entre a média dos pontos obtidos no escore de Shwachman e o genótipo -308G/A do gene *TNF α* na amostra avaliada.

O escore de Kanga demonstrou que no momento da realização do exame a maioria (88,37%) dos pacientes não estava em exacerbação e que destes pacientes 71,05% são homozigotos para o alelo 2. A classificação da gravidade obtida através da saturação transcutânea de oxigênio pela hemoglobina demonstrou que 72,09% dos indivíduos são considerados normais e que destes a maioria (63,33%) é homozigota para o alelo 2. Estes dados são contrários à proposição de Hull e Thompson (1998) de que o alelo 2 seja associado com uma doença pulmonar mais severa. Entretanto, está de acordo com Schmitt-Grohé et al. (2006) e Yarden et al. (2005) que descrevem este polimorfismo como não modificador da gravidade da FC. Se a saturação pressupõe a progressão

da doença e a maioria dos pacientes está normal, apesar de o diagnóstico ter sido realizado tardiamente (baseado no pressuposto de que o diagnóstico ocorresse precocemente) pode indicar, novamente, que o tratamento tem sido eficiente.

Devido aos resultados encontrados na amostra avaliada não há associação significativa entre a variante -308G/A e a gravidade da FC.

5.2.2. Análise do polimorfismo -238G/A

Dos 49 indivíduos estudados para esse polimorfismo, 79,59% são portadores do genótipo G em homozigose, e 20,41% são heterozigotos. As frequências alélicas encontradas foram de 0,90 e 0,10 para o alelo G e A respectivamente. Buranawuti et al. 2007 em seu trabalho no qual foram analisadas 101 crianças e 115 adultos com a FC, também encontraram o genótipo GG na maioria dos indivíduos analisados, 91,1% e assim como no presente estudo também não foram encontrados indivíduos com o genótipo AA. Yarden et al., 2005 em seu estudo com 180 indivíduos $\Delta F508/\Delta F508$ também encontraram o genótipo GG como o mais frequente (88,2%), e o genótipo AA foi detectado em apenas 1,2% dos pacientes estudados.

A utilização da idade em que o diagnóstico foi realizado e idade de início dos sintomas pulmonares e digestivos não mostraram diferenças significativas. Era esperado que as idades de diagnóstico e de início dos sintomas ocorressem na maioria dos pacientes até o primeiro ano de vida, o que denotaria um pior prognóstico e apresentação mais severa da doença. Esse fato era esperado pois se trata de um grupo de pacientes que possuem mutações de classe I e ou II, ou seja, que têm um prognóstico pior. Portanto, a idade de início dos sintomas e de diagnóstico deveria ser precoce.

Com relação à idade em que a bactéria *P. aeruginosa* foi detectada pela primeira vez, não foi encontrado um valor significativo na amostra avaliada, o que indica que não deve haver influência do genótipo -238G/A do gene *TNFA*. Este dado está de acordo com o que foi descrito por Yarden et

al, (2005) com $p=0,64$. Como era esperado que a maioria dos pacientes tivesse um diagnóstico precoce, esperava-se que a idade da primeira infecção pela bactéria fosse tardia, já que com o tratamento começando precocemente a infecção seria retardada. Mas, não foi o que aconteceu. Houve uma distribuição similar entre as faixas etárias provavelmente porque o tratamento tem sido eficiente. É sabido que quanto mais precoce for a infecção pela *P. aeruginosa* mais rápido acontecerá o declínio da função pulmonar. Possivelmente os pacientes que apresentam uma idade tardia de infecção são aqueles que tiveram o diagnóstico precoce.

Na classificação da gravidade pelo VEF1, 70,96% dos indivíduos foram classificados como apresentando fenótipo normal e leve. Não houve variação nas médias de VEF1 entre o genótipo -238G/A do gene *TNF α* ($p=0,4973$). Esses resultados concordam com os obtidos por Yarden et al. (2005) que não encontraram diferenças significativas entre a média de VEF1 nos genótipos referentes ao gene *TNF α* na amostra, com um $p=0,8$.

Quando foi realizada a distribuição dos genótipos do gene *TNF α* na amostra em relação à classificação obtida pelo escore de Shwachman, não foi observada diferença significativa. Quando foi feita a média dos pontos obtidos pelo escore observou-se que não foi encontrado valor de p significativo.

O escore de Kanga demonstrou que no momento da realização do exame a maioria (88,37%) dos pacientes não estava em exacerbação, e que destes pacientes 81,57% são homozigotos para o alelo G. A classificação da gravidade obtida através da saturação transcutânea de oxigênio pela hemoglobina demonstrou que 72,09% dos indivíduos são considerados normais e que destes a maioria (70,96%) é homozigota para o alelo G. Se a saturação pressupõe a progressão da doença e a maioria dos pacientes está normal, apesar de o diagnóstico ter sido realizado tardiamente (baseado no pressuposto de que o diagnóstico ocorresse precocemente) pode indicar, novamente, que o tratamento tem sido eficiente.

Com base nos resultados encontrados, na amostra avaliada não há associação significativa entre a variante polimórfica -238G/A e a gravidade da FC, assim como proposto por Yarden et al. (2005).

5.3 *ADIPOQ*

Baixos níveis de adiponectina promovem inflamação e estão relacionados com o aumento da resistência à insulina e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Fantuzzi, 2008). Além disso, a adiponectina está relacionada com a regulação do balanço energético (Moriconi et al., 2006). Indivíduos com FC possuem uma deficiência crônica de energia e portanto maiores concentrações de adiponectina. Como na FC muitas vezes ocorre a deficiência crônica de energia, fica explicado o motivo de se encontrar a adiponectina mais concentrada (Moriconi et al., 2006).

A adiponectina também exerce uma variedade de atividades antiinflamatórias pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, indução de fatores antiinflamatórios, entre outros. É descrita uma correlação inversa entre os níveis de adiponectina e inflamação. A FC é uma doença inflamatória. Deste modo, é esperado que os níveis de adiponectina circulante em pacientes que estejam estáveis sejam reduzidos. Entretanto Hammana et al. (2007) descrevem que essa relação não foi encontrada na amostra avaliada. Este grupo não observou relação entre marcadores de inflamação, como a proteína C-reativa (CRP) e o fibrinogênio e níveis de adiponectina, o que sugere que os níveis de adiponectina não estão reduzidos em pacientes com FC que estejam estáveis, ou seja, que apresentem um baixo grau de inflamação. Esse estudo também descreve que os níveis de adiponectina em indivíduos com FC e o controle é similar. Ao contrário do que é descrito por Moriconi et al. (2006), no qual foram encontrados níveis de adiponectina maiores em pacientes com FC do que nos indivíduos controle.

A FC apresenta muitas condições que podem afetar ou estarem associadas com baixos níveis de adiponectina, como inflamação crônica, distribuição central de gordura e resistência à insulina. Moriconi et al. (2006) encontraram níveis mais elevados de adiponectina nos pacientes com FC que foi explicado devido à deficiência no balanço energético desses indivíduos. Fantuzzi (2008) refere que a FC deve ser uma das doenças raras que apresenta altos níveis de adiponectina circulante apesar dos altos níveis de marcadores de inflamação como CRP e resistência à insulina.

Polimorfismos funcionais no gene *ADIPOQ* têm sido identificados como influenciadores dos níveis de adiponectina circulante (Vasseur et al., 2005; Wright et al., 2006). Alguns desses polimorfismos resultam em níveis mais altos de adiponectina em indivíduos com FC o que acarretaria em uma apresentação mais moderada da doença, já que adiponectina atuaria na supressão da inflamação relacionada à doença e melhora do *status* nutricional (Boyle, 2007). Entretanto Takahashi et al. (2000) descreve dois polimorfismos, um no *exon 2* e o outro no *exon 3* que diminuem o nível de adiponectina circulante.

Tem sido demonstrado que a adiponectina atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias circulantes (Wolf et al., 2004). Wright et al. 2006, em um estudo de análise por *microarray* em epitélio nasal em indivíduos $\Delta F508/\Delta F508$, encontraram o *ADIPOQ* mais expresso em indivíduos classificados como apresentando doença pulmonar moderada.

Entretanto, não foi possível estabelecer nenhuma relação entre possíveis alterações no gene *ADIPOQ* e a gravidade da FC, pois não foi encontrada alteração na sequência da região analisada. O método de triagem de mutações escolhido para a análise desse gene não se mostrou eficiente para a sequência em questão. Em dois dos três *exons* analisados foram obtidos muitos padrões no pico de análise, e para o outro *exon*, que foi dividido em duas partes por causa do seu tamanho, em uma das partes a análise no DHPLC não foi eficiente e na outra houve problemas na realização da PCR.

Uma das razões para a falta de eficiência do DHPLC e para os problemas enfrentados na realização das PCR, é que o gene *ADIPOQ* é uma sequência rica em GC o que dificulta tanto a amplificação por PCR, que pode ter sido o motivo para a dificuldade de amplificação da segunda parte do *exon 3*, como também sua análise no DHPLC. Existem fragmentos que não se adaptam no equipamento apresentando picos de análise baixos ou ainda muito padrões de cromatograma, seja por ser uma sequência rica em GC ou por ser uma região que apresenta muitos polimorfismos.

Em relação ao sequenciamento automático foi utilizado o equipamento MegaBACE 1000 para o qual se faz necessário a utilização do kit de reação para sequenciamento específico que baseia-se no princípio da PCR convencional. Deste modo, regiões que sejam de difícil amplificação pela PCR também apresentarão dificuldade na sua análise pela reação de sequenciamento. Além disso, para que a leitura da sequência de bases ocorra corretamente, é preciso que não haja excesso de nenhum reagente como por exemplo nucleotídeos que não tenham sido incorporados na reação. Por este motivo é feita a purificação da reação de sequenciamento antes de sua aplicação no equipamento. Portanto, as PCR a partir das quais serão realizadas as reações de sequenciamento propriamente ditas, devem ser muito específicas e sem excesso de reagentes.

Fica clara a importância da identificação de alterações no gene *ADIPOQ* para o melhor entendimento dos mecanismos de inflamação na FC. Além disso, o estabelecimento da relação do *ADIPOQ* como modificador da gravidade de FC tem uma potencial aplicação em relação ao prognóstico desses indivíduos. Pacientes encontrados em maior risco de desenvolverem complicações serão acompanhados com maior frequência e o tratamento poderá ter início antes mesmo dos sintomas aparecerem.

5.4 *STATH*

Não há muitos artigos que relacionam o *STATH* e a FC. Sabe-se que é formado um peptídeo antimicrobiano presente nas vias aéreas superiores e secreções nasais que participam do desenvolvimento do biofilme da cavidade oral mediando a adesão de bactérias (Boley, 2007). Ultimamente foi identificado como sendo a proteína mais proeminente na interface da saliva como o ar atmosférico (Proctor et al., 2005; Wright et al., 2006).

Como mediadora da adesão de bactérias, a estaterina possui epítomos que promovem o crescimento e adesão na cavidade oral de alguns microrganismos, como *Porphyromonas gingivalis*, enquanto inibe o crescimento de outros, como *S. aureus* (Nieme e Johansson, 2004). Embora sua ação antibacteriana em relação à *P. aeruginosa* ainda não tenha sido investigada, e sabendo-se que a infecção por essa bactéria acelera o declínio na função pulmonar (Nixon et al., 2001), uma proteína que aja determinando a adesão bacteriana na cavidade oral e vias aéreas superiores é de extremo interesse.

A estaterina foi encontrada com uma atividade significativamente maior em indivíduos homozigotos $\Delta F508$ com doença pulmonar moderada. Esse aumento de expressão foi confirmado através de análise do RNA mensageiro produzido pelo gene *STATH* em uma amostra adicional de 12 indivíduos com apresentação severa e moderada da doença pulmonar (Long e Langley, 1999). Wright et al., 2006, em um estudo de análise por *microarray* em epitélio nasal em indivíduos $\Delta F508/\Delta F508$, encontraram o *STATH* mais expresso em indivíduos classificados como apresentando doença pulmonar moderada. Esses dados foram confirmados com análise de outros 12 indivíduos que apresentavam doença pulmonar moderada e grave.

Entretanto, não foi possível estabelecer nenhuma relação entre possíveis alterações no gene *STATH* e a gravidade da FC, pois não foi encontrada alteração nas sequências das regiões

analisadas. O método de triagem de mutações escolhido para a análise desse gene não se mostrou eficiente para a sequencia em questão. Em dois dos três *exons* analisados foram obtidos muitos padrões no pico de análise, somente em um dos *exons* foram obtidos resultados satisfatórios.

Uma das razões para a falta de eficiência do DHPLC e para os problemas enfrentados na realização das PCR, é que o gene *STATH*, assim como o *ADIPOQ*, também possui uma sequencia rica em GC.

Fica claro a importância da identificação de alterações no gene *STATH* para o melhor entendimento dos mecanismos de inflamação na FC. Além disso, o estabelecimento da relação do *ADIPOQ* como modificador da gravidade de FC tem uma potencial aplicação em relação ao prognóstico desses indivíduos. Pacientes encontrados sob maior risco de desenvolverem complicações serão acompanhados com maior frequência e o tratamento poderá ter início antes mesmo dos sintomas aparecerem.

6. Conclusões

As conclusões que chegamos através desse estudo foram:

- ✓ Os genótipos GG, AA e GA do polimorfismo -308G/A do gene *TNF α* , foram encontrado com as seguintes frequências: 14,28, 67,35 e 18,36%.
- ✓ Os genótipos GG, e GA do polimorfismo -238G/A do gene *TNF α* , foram encontrado com as seguintes frequências: 79,59 e 20,41%. O genótipo AA não foi detectado na amostra avaliada.
- ✓ Em nossa amostra não foi possível estabelecer associação entre os polimorfismos no gene *TNF α* e a gravidade do quadro pulmonar;
- ✓ Não foi possível identificar nenhuma alteração de sequência nos *exons* e junções *exon/intron* dos genes *ADIPOQ* e *STATH* nas regiões que foram analisadas.
- ✓ Não foi possível estabelecer uma associação entre a gravidade da FC e os genes *STATH* e *ADIPOQ* nas regiões que foram analisadas.

7. Referências bibliográficas

Abba, A. K.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. *Imunologia: celular e molecular*. Revinter, 1995.

Accurso FJ, Sontag MK. Seeking modifier genes in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 289-3.

Acton JD, Wilmott RW. Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Paed Resp Reviews* 2001; 2: 332-9.

Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan, RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-5.

Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H. Analysis of the *CFTR* gene in Iranian Cystic Fibrosis patient: Identification of eight novel mutations. *Journal of Cystic Fibrosis* 2008; 7: 102-9.

Alvarez AE. Análise clínica e laboratorial de 104 pacientes, com fibrose cística, do ambulatório de pediatria da unicamp, na última década do século XX, com o genótipo e a gravidade da doença [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, Super M, Webb AK, Schwarz M. End-organ dysfunction in cystic fibrosis. *Am J Crit Care Med* 2003, 167: 384-9.

Barth LR. Perfil microbiológico e fatores de gravidade de pacientes com fibrose cística [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

Bienvenue T. Molecular basis of phenotype heterogeneity in Cystic Fibrosis. *Ann Biol Clin* 1997; 55:113-21.

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

Borgo G, Cabrini G, Mastella G, Ronchetto P, Devoto M, Romeo G. Phenotypic intrafamilial heterogeneity in Cystic Fibrosis. *Clin Genet* 1993; 44: 48-9.

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

Buranawuti K, Boyle MP, Cheng S, Steiner LL, McDougal K, Falli DM, et al. Variations in mannose-binding lectin and tumor necrosis factor α affect survival in Cystic Fibrosis. *J Med Genet* 2007; 44: 209-14.

Buscher R, Grasemann H. Disease modifying genes in Cystic Fibrosis: therapeutic option or one-way road? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 374: 65-77.

Cabello GMK, Cabello PH, Llerena JrJ, Fernandes O, Harri A. The 3120+1g a *splicing* mutation in *cfr* is comun in brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol* 2001; 73: 403-09.

Chromas. Disponível em <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>. Acesso em 10 de fevereiro de 2008.

Cigana C, Assael MB, Melotti P. Azitromycin selectively reduces tumor factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51(3): 975-81.

Collins CE, Macdonald-Wicks L, Rowe S, O'Loughlin EV, Henry RL. Normal growth in cystic fibrosis associated with specialised center. *Arch Dis Child* 1999; 81(3): 241-46.

Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256: 774-79.

Correia CAA. Prevalência de seis mutações no gene *CFTR* em portadores de fibrose cística da região de Campinas [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Collaco MJ, Cuttin GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Cur Op Pulm Med* 2008, 14: 559- 66.

Chu C-S, Trapnell B C, Murtagh JJJR, Moss J, Dalemans W, Jallat S. et al. Variable detection of exon 9 coding sequences in Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 1991; 10: 1355-63.

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium - CFGAC. The Cystic fibrosis mutation database.

Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>. Acesso em 05 de junho de 2008.

Cystic-Fibrosis-Symptom.Com – disponível em www.cystic-fibrosis-symptom.com/images/cftr3.jpg
. Acesso em 10 de outubro de 2008.

Davies JC. Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis: pathogenesis and persistence. Paed Resp Rev 2003; 3: 128-34.

Davies JC. New tests for Cystic Fibrosis. Paed Respir Rev 2006; 7(1):141-3.

Dawson KP, Frossard PM. The geographic distribution of Cystic Fibrosis mutations gives clues about population origins. Eur J Pediatr 2000; 159: 496-99.

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

Dodge JA. Male infertility in Cystic Fibrosis. Lancet 1995; 346: 587-8.

Dorfman R, Sandford A, Taylor C, Huang B, Frangolias D, Wang Y. et al. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. J Clin Invest 2008; 118: 1040- 9.

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

Evans AK, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of the meconium ileus on the clinical course of children with Cystic Fibrosis. *Eur Resp J* 2001; 18(5): 784-89.

Faria EJ. Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: *MBL2*, *TGF- β 1* e *CD14* com a gravidade do quadro pulmonar na Fibrose Cística [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.

Fantuzzi G. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 326-30.

Feuillet-Fieux MN, Ferrec M, Gigarel N, Thuillier L, Sermet I, Steffan J, et al. Novel *CFTR* mutations in black Cystic Fibrosis patients. *Clin Genet* 2004; 65: 284-7.

Garaulet M, Hernández-Morante JJ, de Heredia FP, Tébar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. [Public Health Nutr](#) 2007; 10 (10A): 1145- 50.

Gaskin JK. Genetic disorders in gastroenterology and hepatology. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2004; 19: 228.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 918-951.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of eletrolytes in sweat in CF of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23: 545-49.

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

Greger R, Schreiber R, Mall M, Wisner, Hopf A, Briel M, et al. Cystic fibrosis and CFTR. *Eur J Physiol* 2001, 443(supl 1): S3- 7.

Gracia J de, Álvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, Rosa D de la, et al Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in Cystic Fibrosis. *Thorax*. 2005; 558-63.

Gómez-Llourent MA, Suarez A, Gómez-Llourent C, Muñoz A, Arauzo M, Antunes A, et al. Analysis of 31 CFTR mutations in 55 families from the south of Spain. *Early Hum Dev* 2001; 65(supl) S161-4.

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GLC. Terminal truncations destabilize the Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis: a novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873-7.

Hammana I, Malet A, Costa M, Brociero E, Berthaiume Y, Potvin S. Normal adiponectin levels despite abnormal glucose tolerance (or diabetes) and inflammation in adults patients with Cystic Fibrosis. *Diab& Met* 2007; 33: 213- 9.

Hamosh A, King TM, Rosenstein BJ, Corey M, Levison H, Durie P, et al. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation gly-to-aspartate at codon 551 and the $\Delta F508$ mutation are clinically indistinguishable from $\Delta F508$ homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 245-50.

Herrmann SM, Ricard S, Nicud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, et al.. Polymorphisms of the tumor factor α gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 59-66.

Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. Tumor necrosis factor α gene promoter polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Resp J* 2000; 15: 281-4.

Huang, S-L, Su C-H, Chang S-C. Tumor necrosis factor α gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156: 1436-9.

Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. [J Neuroimmunol](#). 1997; 72 (2): 149 -53.

Hull J. Basic science of Cystic Fibrosis. *Current Paediatr* 2003; 13: 253-8.

Hull J, Thompson AH. Contribution of genetics factor other than CFTR to disease severity in Cystic Fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 1018-21, .

Jorde, L. B.; Carey, J. C. C.; Bamshad, M. J.; White R. L. Genética médica, 2ªed., Rio de Janeiro, RJ, Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Kabra SK, Kabra M, Lodha R, Shatri S. Cystic fibrosis in India. *Pediatr Pulmol* 2007; 42: 1087-94.

Kanga J, Kuhn R, Craigmyle L, Haverstock D, Church D. Cystic Fibrosis clinical score: a new scoring system to evaluate acute pulmonary exacerbation. *Clin Ther*. 1999; 21: 1343-56.

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

Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22: 387-95.

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

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

Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC. Genetic determination of pancreatic function in Cystic Fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178-84.

Lappas M, Permezel M, Rice G. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor- κ b, peroxisomal proliferator-activated receptor- γ and extracellularly regulated kinase1/2. *Endocrinology* 2005; 146: 3334- 42.

Long AD, Langley CH. The power of associations studies to detect the contribution of candidate genetic loci variation in complex traits. *Genome Res* 1999; 9: 720-31.

Lucotte G, Hazaut S, Braekeller M de, Complete map of Cystic Fibrosis mutation $\Delta F508$ frequencies in western europe and correlation between mutation frequencies and incidence of the disease. *Hum Biol* 1995; 67: 797-03.

Mcauley DF, Elborn JS. Cystic Fibrosis: basic science. *Paed Resp Rev* 2000; 1: 93- 100.

Mahadeva R, Lomas DA. Secondary genetic factors in Cystic Fibrosis lung disease. *Thorax* 2000; 55: 446.

Marostica PJ, RaskinS, Abreu-e-Silva FA. Analysis of delta f 508 mutation in brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 529-32.

Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationship in Cystic Fibrosis. *Med Clin* 2000; 84(3): 597-607.

MerloCA, Boyle MP. Modifier genes in Cystic Fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 2003; 141 (4):237-41.

Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Tummeler B, Categories of $\Delta F508$ homozygous Cystic Fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotype characteristics. *Twin Research* 2000; 3(4): 277-93.

Moriconi N, Kraenzlin M, Müller B, Keller U, Nusbaumer CPG, Stöhr S. Body composition and adiponectin serum concentrations in adult patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1586- 90.

Nadeau JH. Modifier genes in mice and human. *Nat Rev Genet* 2001; 2(3): 165- 174, 2001.

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarret-Nedwin J, Pennica D. Human lumphotoxin and tumor necrosis factor gene: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-73.

Nieme L. D. & Johansson, I. Salivary statherin pepitide-binding epitopes of commensal and potencial infectious actiomyces spp. Delineated by a hybrid peptide construct. *Infect Immun* 2004; 72: 782-7.

Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeroginosa* infection in Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 2001; 138: 699-04.=

Online Mendelian Inheritance in Man – Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=605441>. Acesso em 05 de junho de 2008.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte- derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-6.

Phillipson GTM, Petrucco OM, Matthews CD. Congenital bilateral absence of the vas deferens, Cystic Fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000; 15(2): 431-5.

Planète gene – Disponível em <http://www.planetegene.com/view/les-differentes-classes-de-mutations-de-la-protein>. Acesso em 05 de junho de 2008.

Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiard PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF α gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42: 501-4.

Prins J B. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol* 2002; 16(4): 639-51.

Proctor GB, Hamdan S, Carpenter GH, Wilde PA. Statherin and calcium enriched layer at the air interface of human parotid saliva. *Biochem J* 2005; 389:111-6.

Raskin S, Phillips III JA, Krishnamani, MRS. DNA analysis of Cystic Fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993; 46: 665-9.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of $\Delta F508$ del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. J Cyst Fibr 2007; 7(1):15-22.

Ratjem F, Dorin G. Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361: 681-9.

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

Ribeiro JD, Ribeiro MAG de, Ribeiro, AF. Controvérsias na Fibrose Cística – do pediatra ao especialista. J Pediatr 2002. 78(S2): 171-86.

Riordan JR. Identification of the Cystic Fibrosis gene. Science 1989; 245: 1066-73.

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

Rommens JM. Identification of the Cystic Fibrosis gene II. Science 1989; 245:1059-1065.

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

Sabatini LM, Carlock LR, Johnson G W, Azen EA. cDNA cloning and chromosomal localization (4p11-13) of a gene for statherin, a regulator of calcium in saliva. Am J Hum Genet 1987; 41: 1048-60.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restrict site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230, 1350-4.

Santana MA, Matos E, Fontoura MS, Franco R, Barreto D, Lemos ACM. Prevalence os pathogens in Cystic Fibrosis patients in Bahia, Brazil. The Braz J Ofec Dis 2003; 7(1): 69-72.

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

Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T. Association of tumor necrosis factor α gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 2001; 163: 420-2.

Schmitt-Grohé S, Stüber F, Book M, Bargon J, Wagner T O, Naujouks C, et al. TNF α promoter polymorphism in relation to TNF α production and clinical status in Cystic Fibrosis. Lung 2006; 184: 99- 104.

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

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

Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fries W, Pius D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 8699-02.

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

Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4465-70.

Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. [Int J Obes Relat Metab Disord](#). 2000; 24 (7): 861-8.

Tilg H, Mosche A. Adipocytocines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev* 2006; 6: 772- 73.

Tsui L-C, Durie P. Genotype and phenotype in Cystic Fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 32:115–42.

Tsui LC, Rommens J, Kerem BS, Zielenski J, Chou L, Bozon D. Molecular genetics of Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1990; S5: 58-9.

Tzetis M, Efthymiadou A, Doudounakis S, Kanavakis E. Qualitative and puntitative analysis of mRNA associated with four putative *splicing* mutation (621+3A→G, 2751+2T→A, 296+1G→C,

1717-9T→C-D565G) and one nonsense mutation (E822X) in the *CFTR* gene. Hum Genet 2001; 109: 592-01.

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

Vasseur F, Helbeque N, Lobbens S, Vasseur-Delannoy V, Dina C, Clément K, et al.

Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes. Diabetologia 2005; 48: 8929.

Vasseur F, Meyre D, Froguel P. Adiponectin, type 2 diabetes and the metabolic syndrome: lessons from human genetic studies. Exp Rev Mol Méd 2006; 8(27): 1-12.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in Cystic Fibrosis. Cell 1993; 73: 1251-4.

Wright JM, Merlo CA, Reynolds JB, Zeitli PL, Garcia JGN, Guggino WB, et al. Respiratory epithelial gene expression in patients with mild and severe Cystic Fibrosis lung disease. Am J Resp Cell Mol Biol 2006; 35: 327-36.

Wilson AG, Vries N, Poicot F, Giovine FS, Van der Putte LBA, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with the HLA a1, b8, and dr3 alleles. J Exp Med 1993; 177: 557-60.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Bioch and biop Res Comm 2004; 323: 630-5.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med 2002; 8: 1288-95.

Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vrgas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez J, Zuñiga J, et al. Polymorphisms in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha and the HLA-DRB1 locus in Mexican Mestizo patients with ulcerative colitis. Immology Letter 2004; 95: 31-5.

Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek MJR, Zemkova D, Vavrova V, et al. Association of tumor necrosis factor alpha variants with the CFulmonary phenotype. Thorax 2005; 60: 320-5.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucl Acids Reser 2001; 29: 18.

Zielenski J, Tsui L-P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. Anu Rev Gen 1995; 29: 777-07.

8. Anexos

8.1. Anexo 1



CEP, 27/11/07.
(PARECER CEP: N° 570/2004)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DOS POLIMORFISMOS – 238g/A, - 308g/A DO GENE *TNF α* ENTRE PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA"

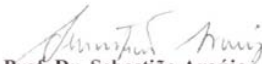
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cyntia Arivabeni de Araujo Correia

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui a realização das análises dos genes ADIPOQ e STATH, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2.007.


Prof. Dr. Sebastião Araújo

VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

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



CEP/FCM/UNICAMP

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

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

CEP, 27/11/07.
(PARECER CEP: Nº 570/2004)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DOS POLIMORFISMOS – 238g/A, - 308g/A DO GENE *TNFA*
ENTRE PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA"

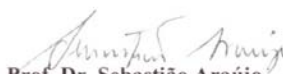
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cyntia Arivabeni de Araujo Correia

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui a realização das análises dos genes ADIPOQ e STATH, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2.007.


Prof. Dr. Sebastião Araújo

VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

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

Página 1 de 1

8.2. Anexo 2

Protocolo de avaliação Clínico-Laboratorial da gravidade da Fibrose Cística.

Data de avaliação: _____

Nome do avaliador _____

Dados pessoais

Nome: _____

HC: _____

Iniciais: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

Cor da pele: _____

Dados Clínico-Laboratorial

Estudo genético: _____

Data do diagnóstico: _____

Idade de início dos sintomas pulmonares: _____

Saturação de oxigênio em ar ambiente: _____

Data da primeira infecção por *Pseudomonas aeruginosa* _____

Espirometria:

Data do exame:

	valor absoluto	% previsto
VEF		
CVF		
FEF 25-75		
VEF/CVF		
VEF pós BD		

8.3. Anexo 3

Escore de Shwachman

A) Nutrição

1. Peso e altura:

☐ P 25 (compatível com padrão familiar)

☐ P 10 (levemente abaixo do padrão familiar)

☐ P 3 (moderadamente abaixo do padrão familiar

☐ P 3 (altura deficiente)

☐ mal-nutrido e baixo

2. Tônus e massa muscular:

☐ normais

☐ bom

☐ regulares

☐ pobres

☐ músculos flácidos, fracos e pequenos

3. Gordura subcutânea:

☐ normal

☐ levemente diminuído

☐ deficiente

☐ deficiência moderada

☐ sem gordura subcutânea

4. Maturação sexual:

☐ normal

☐ leve retardo

☐ maturação retardada

☐ insuficiente

5. Apetite:

☐ bom

☐ mau

☐ normal

☐ perda de peso freqüente

☐ regular

6. Fezes:

☐ normais

☐ fezes pouco formadas, volumosas, mau

☐ fezes mais freqüentemente e leve
alteração

cheiro e gordurosas

☐ fezes volumosas, mau cheiro e flutuantes

☐ fezes freqüentes, volumosas, mau cheiro e
gordurosas (prolapso retal freqüente)

B) Atividade Geral

1- Atividade:

☐ plena

☐ atividade física limitada

☐ leve limitação à atividade intensa

☐ grave limitação da atividade

☐ descansa voluntariamente

2- Tolerância aos exercícios:

☐ normal

☐ tolerância ao exercício limitada (dispnéico
após exercícios)

☐ cansa ao final do dia ou após exercício
prolongado

☐ inativo ou confinado à cama/cadeira
(dispnéia e ortopnéia)

☐ cansa após exercício

3- Disposição:

☐ boa

☐ menos energético, ocasionalmente irritado

ou apático

☐ moderadamente inativo, falta

espontaneidade, passivo ou irritável

☐ agitado, irritado, preguiçoso ou abatido

☐ apático ou irritável

4- Desenvolvimento motor:

☐ normal

☐ limite inferior do desenvolvimento motor

normal

☐ leve retardo motor

☐ retardo motor moderado

☐ marcado retardo motor

5- Frequencia escolar:

☐ normal

☐ boa frequencia escolar

☐ regular frequencia escolar

☐ frequencia escolar baixa (professor particular)

☐ não pode assistir às aulas

C) Exame Físico

1- Tosse:

☐ sem tosse

☐ tosse ocasional

☐ tosse leve e crônica após exercício/choro e ocasionalmente durante o dia (sem tosse noturna)

☐ tosse crônica, freqüente, repetitiva, produtiva, raramente paroxística

☐ tosse paroxística grave, produtiva, freqüentemente com vômitos e hemoptise (tosse noturna)

2- FC e FR:

☐ normais

☐ normais no repouso

☐ levemente aumentada

☐ taquipnéia e taquicardia

☐ moderadamente aumentada

3- Enfisema:

☐ sem enfisema

☐ enfisema moderado a grave, com

☐ enfisema leve

deformidade ao RX

☐ diâmetro antero-posterior e diafragma
rebaixado

☐ enfisema grave

4- Ausculta Pulmonar:

☐ pulmões limpos

☐ crepitanes, roncos e sibilos, usualmente

☐ MV rude, roncos e TE prolonGado
ocasional

presentes e disseminados

☐ MV rude, crepitanes, roncos e sibilos

☐ crepitanes, roncos e sibilos generalizados

5- Baqueteamento digital:

☐ sem baqueteamento

☐ baqueteamento 2/3

☐ baqueteamento leve

☐ baqueteamento 3/4

☐ baqueteamento 1/2

D) Achados Radiológicos:

1- Enfisema:

☐ sem enfisema

☐ moderado diâmetro AP; campos

☐ evidências mínimas

pulmonares + radiolucentes

☐ enfisema marcado

☐ alterações extensivas, hiperinsuflação grave

2- Trama bronco-vascular:

☐ sem aumento

☐ trama aumentada

☐ aumento leve da trama

☐ aumento marcado da trama

3- Infiltrado pulmonar:

☐ sem infiltrações

☐ focos persistentes de infiltrações

☐ infiltrado ocasional transitório

☐ infiltrados disseminados

4- Atelectasias:

☐ sem atelectasias

☐ atelectasias localizadas ou irregulares

☐ atelectasias segmentares ou lobares ocasionais, cistos localizados

☐ atelectasias lobares persistentes, formação de bronquiectasias, cistos disseminados e abscessos

8.4. Anexo 4

Escore de Kanga

Subjetivos	1	2	3	4	5
Tosse	Sem tosse	Ao exercício e fisioterapia	Frequente	Dia e noite	Dia e noite+dor torácica
Secreção	Sem secreção	Ocasional, fisioterapia	Pouca quantidade	Aumentada, escura	Abundante, sangue
Apetite	Excelente	Bom	Normal	Diminuído	Pobre
Dispnéia	Sem dispnéia	Ao exercício	Subir escadas	Atividades de vida diária	Sempre
Energia	Excelente	Boa	Estável	Pobre	Letárgico

Objetivos	1	2	3	4	5
Temperatura	< ou = 37.1°C	37.2° - 37.9°C	38 - 38.3°C	38.4 - 38.8°C	> ou = 38.9°C
Peso	Aumento > ou = a 1	Aumento de 0.4 – 0.99	= ou – 0.39	Queda de 0.4 – 0.99	Queda de > ou = 1
Frequencia respiratória	Normal	+2 SD	+3 SD	+4 SD	+5 SD
Sons respiratórios	Normais	Alteração 1	“2	“3	“4
Crepitação	Sem	1	2	3	4

Total: subjetivos + objetivos = máximo 50 (gravidade)

> 25 exacerbação

< 25 estável