

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EXTRA-GÊNICOS ASSOCIADOS À
GRAVIDADE DA DOENÇA PULMONAR EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Giovana Bavia Bampi

*Trabalho apresentado como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel no
Curso de Ciências Biológicas - Ênfase
Celular, Molecular e Funcional.*

Orientador:

Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Porto Alegre, novembro de 2011

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira pela oportunidade, ensinamento, paciência e, acima tudo, por ter me mostrado sobre como é a árdua jornada, porém não menos gratificante, de “fazer” Ciência.

Aos colegas do Laboratório de Identificação Genética pelo aprendizado e esclarecimentos em todos os momentos em que precisei.

Aos meus pais, Sergio e Mery, pelo amor incondicional, por terem sempre acreditado em mim e por terem me apoiado em todas as minhas decisões.

Ao meu irmão, Bruno, pelo apoio e conselhos pertinentes.

Aos demais familiares pelo carinho e descontração nos tradicionais almoços de Domingo na casa do Vô Donato.

Às instituições que forneceram o apoio financeiro para realização deste trabalho: CNPq, FAPERGS, UFRGS e HCPA.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------|----|
| Resumo | 6 |
| Palavras chave | 6 |
| Introdução | 7 |
| Materiais e Métodos | 10 |
| Resultados | 13 |
| Discussão | 15 |
| Agradecimentos | 18 |
| Referências | 19 |
| Figuras | 21 |
| Tabelas | 23 |
| Anexo | 26 |

Este trabalho foi elaborado na forma de artigo científico, segundo as normas da revista *Journal of Medical Genetics*, apresentadas em anexo.

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EXTRA-GÊNICOS ASSOCIADOS À
GRAVIDADE DA DOENÇA PULMONAR EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**

Giovana Bavia Bampi^{1,2}, Édina Poletto^{1,2}, Fernando Abreu e Silva³, Maria Teresa
Vieira Sanseverino², Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,4}

¹Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisas – Hospital de Clínicas de
Porto Alegre – RS - Brasil

²Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS – Brasil

³Serviço de Pneumologia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS – Brasil

⁴Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – RS -
Brasil

Endereço para correspondência:

Maria Luiza Saraiva Pereira, PhD

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-003

Porto Alegre – RS – Brasil

Tel: +55 51 3359 8011

Fax: +55 51 3359 8010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

RESUMO:

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene da condutância transmembrânica da fibrose cística (*CFTR*), o qual codifica uma proteína localizada na membrana de células epiteliais e funciona como canal de cloro. A FC afeta múltiplos órgãos, mas a doença pulmonar é a principal causa de morte dos pacientes. Estudos que correlacionam o genótipo *CFTR* com a gravidade da doença, sugerem que modificadores genéticos, como variáveis polimórficas podem estar envolvidos na biologia da doença. O objetivo deste trabalho foi identificar dois polimorfismos extra-gênicos ao *CFTR* e correlacioná-los com a gravidade da doença pulmonar em pacientes com FC. O genótipo de 58 pacientes homocigotos para Phe508del para SNPs nos *loci* 11p13 e 20q13.2 foram determinados, comparados com as frequências genotípicas e alélicas de indivíduos controles e associados, quando a informação estava disponível, a taxa de redução anual da capacidade pulmonar. Não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas dos dois grupos para ambos *loci*. Além disso, os índices de redução da capacidade respiratória também não atingiram diferença significativa entre os grupos genotípicos. Os resultados do presente trabalho sugerem que outros SNPs nesses *loci* ou mesmo *loci* adicionais podem apresentar maior relevância biológica na doença pulmonar em pacientes com FC da nossa região.

PALAVRAS CHAVE:

Fibrose cística; doença pulmonar; Phe508del; *loci* modificadores.

INTRODUÇÃO:

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva com incidência de 1 caso para cada 2.500 nascidos-vivos. [1] Entretanto, essa incidência é variável de acordo com a origem étnica dos pacientes. Na população brasileira, a frequência da FC varia de estado para estado devido à taxa variada de miscigenação. No Rio Grande do Sul, a incidência estimada é de 1 caso em 1.587 indivíduos, incidência semelhante à população europeia. [2]

A FC é causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (*CFTR*), o qual localiza-se no braço longo do cromossomo 7 (*locus* 7q31). Esse gene codifica para uma proteína de 1480 aminoácidos, a qual funciona como um canal de cloro em células epiteliais. [3-5] A falta da proteína CFTR funcional leva à formação de secreções desidratadas e viscosas nos pulmões, no pâncreas, no sistema biliar, na genitália masculina, no intestino e nas glândulas sudoríparas, sendo, portanto, uma doença multissistêmica. [1]

As manifestações clínicas abrangem um grande espectro de sinais, que variam de pacientes apresentando apenas alterações bioquímicas até pacientes que apresentam um quadro clínico complexo. Dentre essas, a doença pulmonar obstrutiva crônica, que resulta em falência pulmonar devido à obstrução das vias aéreas, é a principal determinante de mortalidade em pacientes afetados com FC. [6,7] A progressão e a gravidade da doença pulmonar são medidas pelo exame de espirometria, que quantifica o volume de ar expirado em 1s (*forced expiratory volume in 1s* – FEV₁). Estas medidas vêm a ser o aspecto mais variável no fenótipo da FC. [8-11]

A heterogeneidade alélica é a principal responsável pela variabilidade fenotípica da doença pulmonar. No entanto, diferentes aspectos do fenótipo da FC parecem ser

modulados por outros modificadores ainda não bem determinados. Até o momento, aproximadamente 1900 variações de sequência foram descritas no gene *CFTR*. [12] Entretanto, aproximadamente 70% dos alelos na estimativa mundial apresentam uma deleção de 3 pares de bases (bp), denominada Phe508del (ou $\Delta F508$), a qual é responsável pela perda do resíduo fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR. [12] Dentro do grupo de indivíduos homocigotos para Phe508del, a gravidade da doença pulmonar pode ser bastante variável, inclusive entre pacientes da mesma família, demonstrando que o genótipo *CFTR* por si só não é o único fator que influencia nesse processo. Outros fatores, portanto, podem modificar o curso da doença pulmonar.

O estudo mais aprofundado do *CFTR* e de suas variantes permitiram o melhor entendimento sobre as bases etiológicas da doença. Entretanto, há pouco conhecimento sobre os fatores que modificam a sua gravidade, visto que pessoas com o mesmo genótipo apresentam um quadro clínico bastante distinto. [13]

Apesar de vários fatores ambientais piorarem o quadro clínico dos pacientes, como exposição ao cigarro, existe um interesse crescente na tentativa de identificar outros genes que atuam como modificadores do fenótipo da doença de pulmão. Algumas variantes polimórficas foram identificadas em genes candidatos, as quais podem desempenhar um papel importante na deterioração da função pulmonar. [10] Esses genes modificadores podem estar envolvidos na fisiopatologia da doença, como parte da resposta do organismo à doença, ou em caminhos para novos alvos terapêuticos .

Os maiores esforços no estudo da FC concentram-se na aquisição de informações genotípicas e fenotípicas de um grande número de pacientes para elucidar o papel desses *loci* modificadores. Recentemente, um estudo de associação (GWAS – *Genome Wide Association Studies*) demonstrou que dois *loci* no genoma humano, um no cromossomo 11p13 e outro no cromossomo 20q13, apresentam associação significativa em pacientes homocigotos para a mutação Phe508del. [9] Esse estudo foi

conduzido em uma coorte de pacientes euro-descendentes do hemisfério norte. Nenhum estudo semelhante foi realizado em outras regiões do mundo. Portanto, a identificação desses polimorfismos e a correlação dos mesmos com a doença pulmonar em pacientes diagnosticados no nosso laboratório pode fornecer informações inéditas sobre o assunto. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar dois polimorfismos extra-gênicos ao *CFTR* e correlacioná-los com a gravidade da doença pulmonar em pacientes com FC homocigotos para Phe508del diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

MATERIAIS E MÉTODOS:

Amostra

A amostra foi composta por 58 pacientes com FC homocigotos para a mutação Phe508del, os quais foram examinados clinicamente no Serviço de Pneumologia do HCPA e encaminhados para o Serviço de Genética Médica do HCPA, onde foi realizada a análise molecular.

A frequência dos polimorfismos foi estabelecida em um grupo controle composto por 100 indivíduos (50 homens e 50 mulheres) não-aparentados e sem sinais clínicos de FC. Essas amostras dos indivíduos normais fazem parte de um banco de DNA de amostras anônimas.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA.

Isolamento do DNA

O DNA genômico foi isolado a partir de uma amostra de sangue periférico coletado por punção venosa usando EDTA como anti-coagulante. A metodologia utilizada foi a precipitação em excesso de sais. [14] O DNA foi quantificado pelo método fluorimétrico *Quant-itTM* utilizando o aparelho *Qubit (Invitrogen, USA)* e diluído a uma concentração de 2ng/μl, sendo armazenado a -18°C até o momento das análises.

Genotipagem dos SNPs

Os polimorfismos rs12793173 e rs6024460 foram analisados através do uso de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sondas específicas para cada um dos *loci*, baseado em ensaios *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*) números 32033139_10 e 30318130_20, respectivamente.

A amplificação das regiões de interesse foi realizada em um volume final de 12µL, contendo 10ng de DNA genômico, 0,3µL de *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assays* 40X e 6µL de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix*[®] 2X, no equipamento *ABI 7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). O programa para amplificação incluiu um ciclo de inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão pela enzima DNA polimerase.

Após a reação de amplificação, a identificação do genótipo dos indivíduos foi realizada pelo ensaio de discriminação alélica, através da captação da fluorescência emitida a uma temperatura de 60°C durante 1 minuto, e os resultados foram analisados pelo programa *7500 System SDS v1.4 Software* (*Applied Biosystems*).

Avaliação da doença pulmonar

O volume de ar expirado em 1s (*forced expiratory volume in 1s – FEV₁*) foi utilizado para medidas quantitativas de avaliação da capacidade pulmonar. De cada paciente, uma medida inicial e o último FEV₁ foram adotados como parâmetros levando em consideração a idade do paciente no momento do exame. Baseado nesses valores, o índice anual de redução da capacidade pulmonar foi calculado a partir da fórmula abaixo para fins de comparação entre os grupos genotípicos

$$FEV_{1f} = (1,00 - cp)^N \cdot FEV_{1i}$$

onde,

FEV_{1f} = medida final do volume expiratório forçado em 1s

FEV_{1i} = medida inicial do volume expiratório forçado em 1s

N = diferença entre a idade do paciente em FEV_{1f} e a idade em FEV_{1i}

cp = índice anual de redução da capacidade pulmonar.

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas para cada *locus* foram estimadas pelo método de contagem. A comparação das frequências encontradas nos dois grupos foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson com correção de Yates quando necessário ou pelo teste exato de Fisher, sendo considerado significativo quando o $p < 0,05$.

A associação entre os polimorfismos e o índice anual de redução da capacidade pulmonar (cp) foi avaliada através do teste de Kruskal-Wallis para comparação de mediana, sendo considerado significativo quando o $p < 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote SPSS v.18.

RESULTADOS:

Os resultados da análise do polimorfismo rs12793173 (*locus* 11p13) do grupo dos 58 pacientes permitiram a estratificação dos pacientes como descrito a seguir. Vinte e nove deles foram identificados como homozigotos para o alelo T (0,500), 23 indivíduos são heterozigotos (0,397) e 6 indivíduos foram identificados como homozigotos para o alelo C (0,103). A figura 1 demonstra os resultados de algumas amostras analisadas para esse polimorfismo. Baseado na distribuição dos genótipos, as frequências alélicas foram estabelecidas em 0,698 e 0,302 para o alelo T e o alelo C, respectivamente. No grupo controle, 64 indivíduos foram identificados como homozigotos para o alelo T (frequência genotípica igual a 0,640), 30 heterozigotos (0,300) e 6 homozigotos para o alelo C (0,060). As frequências alélicas obtidas foram 0,790 para o alelo T e 0,210 para o alelo G.

Os resultados obtidos nos dois grupos (pacientes e controles) foram comparados e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições genotípicas ($\chi^2=3,155$; $p=0,206$) e nem entre suas frequências alélicas ($\chi^2=2,872$, $p=0,09$) (tabela 1).

Nas análises do polimorfismo rs6024460 (*locus* 20q13), a distribuição genotípica foi identificada como 39 indivíduos homozigotos para o alelo A (0,672), 19 indivíduos heterozigotos (0,328) e não foram identificados indivíduos homozigotos para o alelo G. A partir desses dados, a frequência do alelo A foi estimada em 0,836 e a frequência do alelo G foi estimada em 0,164. O grupo controle foi composto por 65 indivíduos homozigotos para o alelo A (0,650), 31 indivíduos heterozigotos (0,310) e 4 indivíduos homozigotos para o alelo G (0,040). Portanto, a frequência do alelo A foi estabelecida em 0,805 e a do alelo G foi estabelecida em 0,195.

Ambas as frequências alélicas e genóticas desse polimorfismo também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os dois grupos estudados ($\chi^2= 0,292$, $p=0,589$; $\chi^2= 1,994$, $p=0,418$, respectivamente) (tabela 2).

Os pacientes foram também agrupados conforme o genótipo identificado nos dois *loci* estudados, considerando rs12793173 e rs6024460, respectivamente. O genótipo mais frequente nessa coorte foi o TT/AA, o qual foi identificado em 20 pacientes (34,48%) (tabela 3).

O índice de redução anual da atividade pulmonar foi avaliado em cada grupo genotípico, considerando os pacientes em que foi possível obter esse dado. Esse índice foi comparado entre os membros de cada grupo e, posteriormente, a mediana foi calculada em um deles. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3 e na figura 2.

A figura 2 mostra a distribuição da taxa anual de redução da capacidade pulmonar e as medianas para cada um dos grupos genotípicos. Não há diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos genotípicos, demonstrando que a evolução das condições respiratórias dos pacientes é muito similar entre os mesmos. Do grupo CC/AA havia apenas 1 indivíduo genotipado. O grupo CC/AA apresentou a maior variabilidade em relação ao fenótipo da gravidade pulmonar.

DISCUSSÃO:

Pacientes com FC apresentam insuficiência pulmonar e a maioria deles morre no início da idade adulta em decorrência do agravamento da doença pulmonar. Avaliações periódicas do FEV₁ são úteis para avaliar a capacidade pulmonar e prever a sobrevida do paciente. [15] Entretanto, essa avaliação só pode ser realizada a partir dos 6 anos de idade [9], o que limita a obtenção desse dado.

Nesse trabalho, o genótipo de dois SNPs localizado em dois *loci*, descritos recentemente como modificadores da função pulmonar, foram avaliados em 58 pacientes com FC homozigotos para Phe508del. O genótipo do *CFTR* de parte desses pacientes já tinha sido identificado anteriormente [16] e os demais foram avaliados para esse trabalho. As medidas de FEV₁ foram obtidas através de dados retrospectivos, ficando limitada à disponibilidade das mesmas. Consequentemente, a associação dos dados laboratoriais aos dados clínicos foi realizada em 38 pacientes.

Os pacientes incluídos nesse estudo (homozigotos para Phe508del) representam aproximadamente 33% do total de pacientes diagnosticados com FC na nossa região. [16] Essa frequência é mais baixa que em outras regiões do mundo, especialmente em países do hemisfério norte. Isso é um limitante para o nosso estudo, visto que inclui apenas os pacientes com esse genótipo identificados no HCPA.

A avaliação dos SNPs permitiu determinar que as frequências genótípicas e alélicas obtidas nos pacientes com FC são semelhantes aos indivíduos controles da nossa população, mas diferentes dos dados internacionais. [17] Esses dados confirmam a importância da realização de estudos na população local para confirmação das frequências de variantes alélicas.

Visando a comparação dos dados de FEV₁, uma fórmula matemática foi utilizada para obtenção e comparação entre os índices anuais de redução da capacidade pulmonar baseado no modelo matemático de progressão geométrica, visto que a doença progride de forma exponencial. No presente estudo, os índices de redução da capacidade respiratória não atingiram diferença significativa entre os grupos. Esse resultado não permite a identificação de um alelo de risco nessa coorte. Os dados obtidos no trabalho de Wright e colaboradores identificou o alelo C no SNP rs12793173 (cromossomo 11) como alelo de risco em pacientes norte-americanos homozigotos para Phe508del com fenótipo pulmonar grave. [9] Na nossa amostra, o alelo C não foi identificado como agravante. Observamos também que pacientes homozigotos para o alelo de risco (alelo C) demonstraram melhora do estado clínico, considerando as medidas de FEV₁. Esta evidência pode ser explicada pelo fato da FC ser uma doença complexa e que outros fatores, além de modificadores genético, possam estar interferindo na biologia da doença.

Os resultados do presente trabalho sugerem que outros SNPs nesses *loci* ou mesmo *loci* adicionais podem apresentar maior relevância biológica na doença pulmonar em pacientes com FC da nossa região. As regiões avaliadas nesse estudo foram identificadas em pacientes caucasóides, na sua grande maioria. [9] Os pacientes incluídos nesse estudo são provavelmente mais miscigenados, conforme trabalhos descritos na literatura. [18] Esse fato é corroborado pelas frequências alélicas diferentes obtidas entre a população normal da nossa região e os dados internacionais. Desta forma, a avaliação desses outros modificadores em potencial é bastante relevante e importante para determinação de modificadores em populações com origem étnica distinta da população analisada no trabalho de Wright e colaboradores.

Atualmente, pelo menos 10 genes já foram identificados como moduladores fenotípicos da FC. [7,10] O gene AP1P, por exemplo, próximo à região do polimorfismo

rs12793173, está envolvido com o mecanismo de apoptose no processo inflamatório do pulmão. A função dos genes próximos à região do polimorfismo rs6024460, por outro lado, não foram tão estudados até o momento. Mas, alguns deles, como por exemplo o *MC3R*, apresenta funções relacionadas com desempenho pulmonar. [9] Portanto, avaliação da expressão desses genes pode também fornecer outras informações relacionadas à modulação da expressão do *CFTR*.

Neste trabalho, nenhuma associação entre os polimorfismos e o fenótipo da doença pulmonar foi evidenciada. Entretanto, a investigação de outras regiões com a inclusão de um maior número de pacientes, como tem sido feito em trabalhos de colaboração internacional, podem identificar outras localizações genômicas relevantes. Por fim, os dados abordados são inéditos no hemisfério sul e indicam a inclusão de outros candidatos a moduladores fenotípicos em estudos futuros na nossa amostra.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem os pacientes e seus familiares por terem concordado em participar deste trabalho.

O presente trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

REFERÊNCIAS:

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F and Cutting GR. Cystic Fibrosis: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th edition. New York: Mc Graw-Hill 2001:5121-80.
2. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR in newborns and patients. *J Cystic Fibrosis* 2008;**7**:15-22.
3. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;**245**:1073-80.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S et al. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989;**245**:1066-73.
5. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;**245**:1059-65.
6. Chmiel JF and Davis PB. State of art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003;**4**:8-20.
7. Rowtree RK and Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;**67**:471-85.
8. Witt H. New modifier loci in cystic fibrosis. *Nature Genet* 2011;**43**: 508-509.
9. Wright FA, Strug LJ, Doshi VK et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nature Genet* 2011;**43**:539-46.
10. Drum ML, Konstan MW, Schluchter MD et al. Genetic modifier of lung disease in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med* 2005;**353**:1443-53.

11. Cutting GR. Modifier genes in mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann. NY Acad. Sci* 2010;**1214**:57-69.
12. Cystic Fibrosis Mutation Database <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>: acesso em novembro de 2011.
13. Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1993;**329**:1308-13.
14. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**:1215.
15. Schluchter MD, Konstan MW, Drumm ML, Yankaskas JR, Knowles MR. Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary functional data. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;**174**:780-6.
16. Streit C, Neto-Burlamarque CA, Silva-Abreu F, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Molecular Gen Metab* 2003;**78**:259-64.
17. UCSC Genome Bioinformatics <http://genome.ucsc.edu/> acesso em novembro de 2011.
18. Parra FC, Amado RC, Pena SD et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003;**100**:177-82

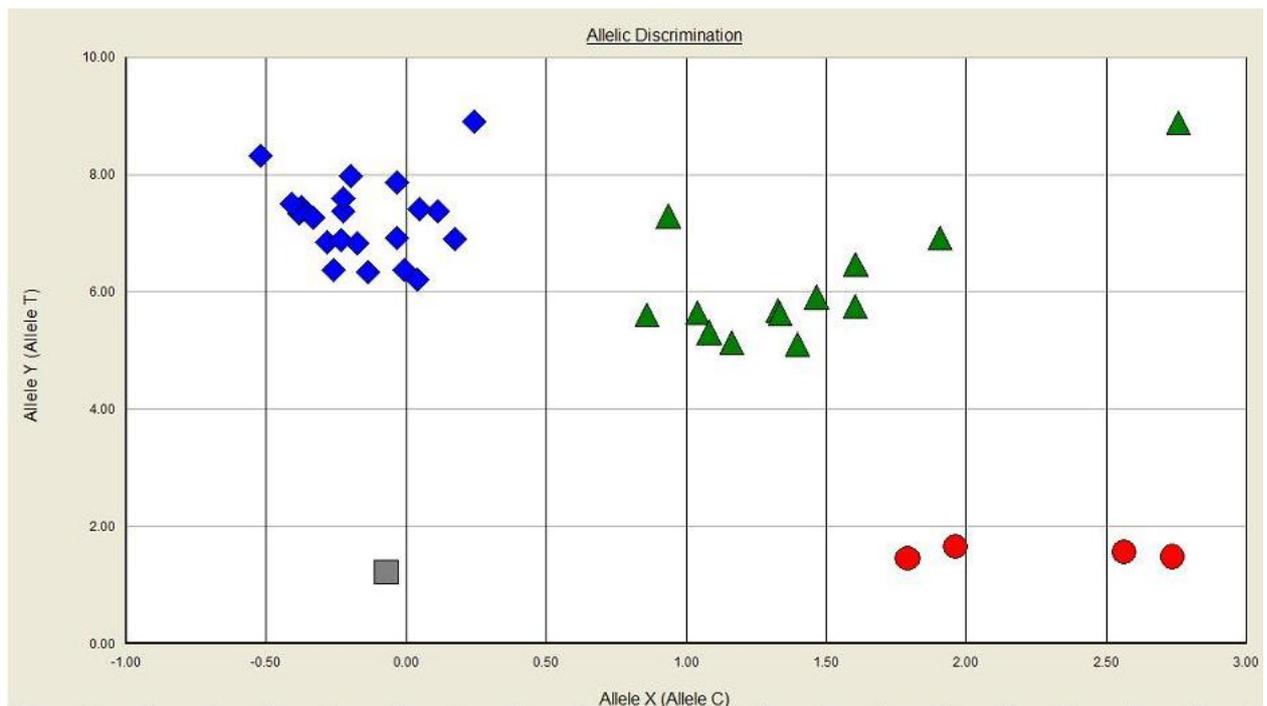


Figura 1. Discriminação alélica do polimorfismo rs12793173 (*locus* 11p13). Os losângulos representam amostras homozigotas para o alelo T; os triângulos representam amostras heterozigotas e os círculos representam amostras homozigotas para o alelo C; o quadrado representa o tubo branco da análise.

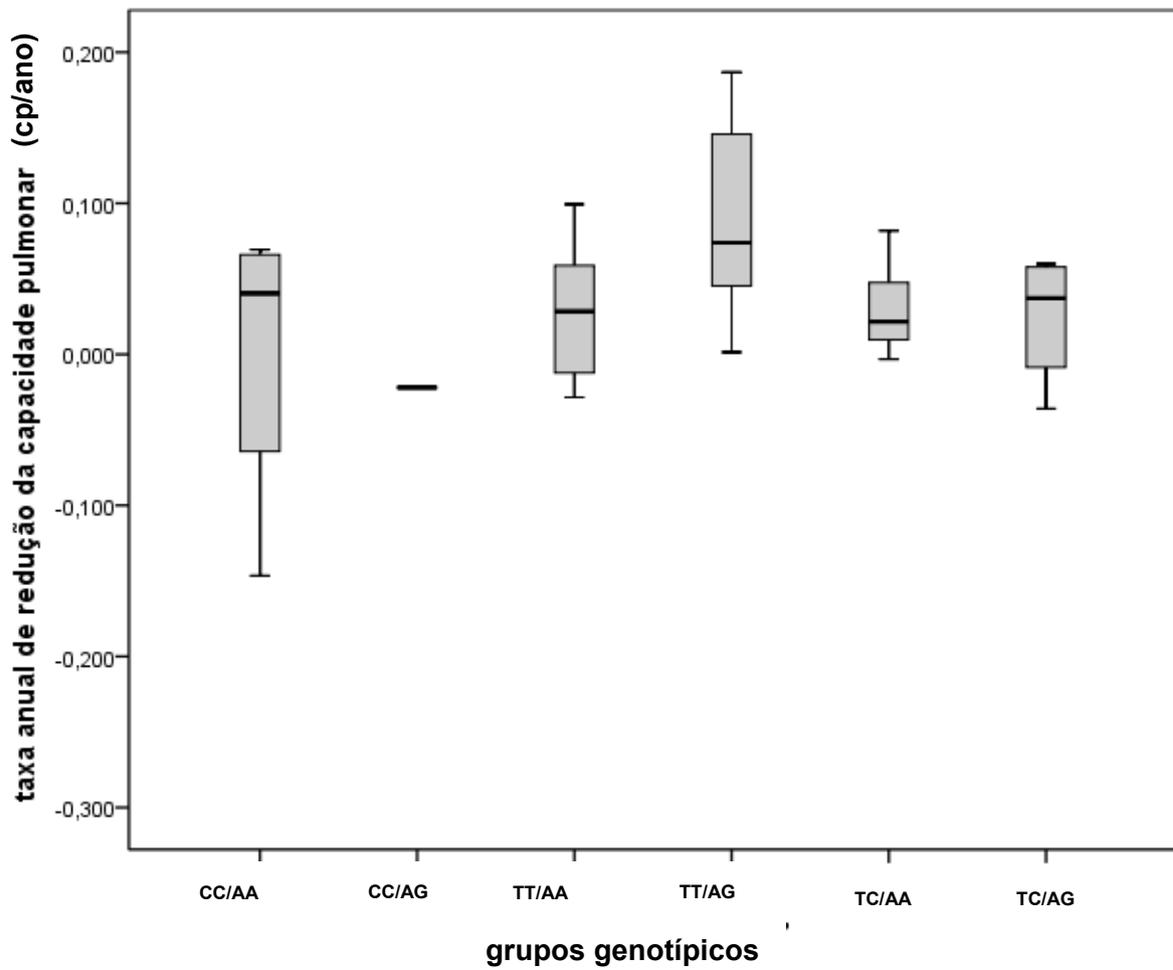


Figura 2. Mediana das taxas anuais de redução da capacidade pulmonar (FEV₁) em cada grupo genotípico.

Tabela 1. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs12793173 (*locus* 11p13). As frequências relativas de cada grupo encontram-se entre parênteses.

| Grupo | Genótipos | | | n | Valor <i>p</i> | Alelos | | n | Valor <i>p</i> |
|-------------------------|---------------|---------------|--------------|-----|--------------------|----------------|---------------|-----|--------------------|
| | T/T | T/C | C/C | | | T | C | | |
| Pacientes com FC | 29 (0,500) | 23 (0,397) | 6 (0,103) | 58 | 0,206 ^a | 81 (0,698) | 35 (0,302) | 116 | 0,090 ^b |
| Controles | 64 (0,640) | 30 (0,300) | 6 (0,060) | 100 | | 158 (0,790) | 42 (0,210) | 200 | |

^a Teste do qui-quadrado de Pearson ($\chi^2=3,155$); ^b Teste do qui-quadrado com correção de Yates ($\chi^2=2,872$).

Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs6024460 (*locus* 20q13.2). As frequências relativas de cada grupo encontram-se entre parênteses.

| Grupo | Genótipos | | | n | Valor <i>p</i> | Alelos | | n | Valor <i>p</i> |
|-------------------------|---------------|---------------|--------------|-----|--------------------|----------------|---------------|-----|--------------------|
| | A/A | A/G | G/G | | | A | G | | |
| Pacientes com FC | 39 (0,672) | 19 (0,328) | - | 58 | 0,418 ^a | 97 (0,836) | 19 (0,164) | 116 | 0,589 ^b |
| Controles | 65 (0,650) | 31 (0,310) | 4 (0,040) | 100 | | 161 (0,805) | 39 (0,195) | 200 | |

^a Teste exato de Fisher ($\chi^2=1,994$); ^b Teste do qui-quadrado com correção de Yates ($\chi^2=0,292$).

Tabela 3. Distribuição dos pacientes em grupos genotípicos e a correlação com a avaliação da capacidade pulmonar.

| Grupo genotípico | n | % | n | Capacidade pulmonar (mediana) (%) |
|-------------------------|-----------|---------------|-----------|------------------------------------------|
| CC/AA | 5 | 8,62 | 4 | 4,0 |
| CC/AG | 1 | 1,72 | 1 | -2,2 |
| TT/AA | 20 | 34,48 | 12 | 2,8 |
| TT/AG | 9 | 15,52 | 7 | 7,4 |
| TC/AG | 9 | 15,52 | 4 | 3,7 |
| TC/AA | 14 | 24,14 | 10 | 2,1 |
| Total | 58 | 100,00 | 38 | |

ANEXO

Normas para submissão de manuscritos à “*Journal of Medical Genetics*” .

About Journal of Medical Genetics

Aims and Scope

Journal of Medical Genetics is a leading international publication covering original research in human genetics, including reviews of and opinion on the latest developments. Articles cover the genetic basis of human disease including germline cancer genetics, the clinical manifestations of genetic disorders, applications of molecular genetics to medical practice and the systematic evaluation of such applications. Each edition includes original articles, short reports, review articles, hypothesis articles, book reviews, online mutation reports and e-letters where readers are invited to comment on material published in the journal. With Editorial Board members from all around the world (including the US, Canada, Europe, Australasia and the Far East), JMG strives to represent and, more importantly, to participate in the shaping of trends and opinions in human genetics research worldwide.

Ownership

Journal of Medical Genetics is owned by the BMJ Group.

Journal Statistics

| | |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acceptance rate | 11% for original articles submitted in 2010 |
| Frequency | Monthly |
| Impact factor | 7.037 |
| Indexed by | Index Medicus (Medline), ISI Current Contents (Web of Science), Excerpta Medica (Embase) |
| Launch date | 1964 |
| Lead times | Time from submission to first decision (reviewed papers): 6 weeks (2010) |
| ISSN of JMG | 0022-2593 |
| ISSN of JMG Online | 1468-6244 |

Instructions for Authors

For guidelines on BMJ Journals policy and submission please click on links below.
[□Manuscript Formatting](#) [□Editorial policies](#) [□Patient consent forms](#) [□Licence forms](#) [□Peer Review Process](#) [□Online First process](#)

Editorial policy

The Journal of Medical Genetics publishes original research and reviews relevant to medical genetics. The journal particularly encourages submissions on the molecular basis of human disease, human cancer germline genetics, the clinical manifestations of

genetic disorders, applications of molecular genetics to medical practice, and the systematic evaluation of such applications.

The journal attempts to handle the review process and publication as expeditiously as possible. An increasing number of submissions are declined without external review, usually within days. In such cases, we make an effort to concisely provide the reasons, if not self-evident. The external review process is usually completed within 4 weeks (mean 20 days), but can take longer in some instances. Accelerated publication is available where warranted by scientific urgency and importance. Submissions are accepted only on the understanding that they have not been and will not be published elsewhere, and are subject to editorial revision.

Open access/Unlocked articles

Authors are able to make their articles freely available online, immediately on publication, for a fee, using the Unlocked service. This service is available to any author publishing original research in a BMJ Journal for a fee of £1,200(+VAT)/€1,775(+VAT)/\$2,220.

Colour figure charges

During submission you will be asked whether or not you agree to pay for the colour print publication of your colour images. This service is available to any author publishing within this journal for a fee of £250 per article. Authors can elect to publish online in colour and black and white in print, in which case the appropriate selection should be made upon submission.

Article types and word counts

The word count excludes the title page, abstract, tables, acknowledgements and contributions and the references.

Original papers

Represent a substantial body of laboratory or clinical work. In general, original paper should not exceed 4000 words plus references. Additional data may be presented as supplementary information, which will be published online only should the article be accepted (this can be in any format: text, tables, images, videos, etc.). Original papers should be presented in sections - namely:

- . **The Abstract** should be concise and informative at 250 words or less and structured in sections in the format used by e.g. the British Medical Journal and the Journal of the American Medical Association: **Background** (summary of the problem being considered and hypothesis to be tested), **Methods**, **Results** and **Conclusions**. The purpose of the study should be made clear in the Background section.
- . **Key words** □ A maximum of 5 which should be given beneath the abstract.
- Introduction** □ Description of the background that led to the study. Enunciation of hypothesis to be tested. Relevant previous literature should be cited here.
- Methods** □ Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be clearly explained at the end of this section.
- Results** □ Work should be reported in SI units. Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on validity and significance of results is appropriate but broader discussion of their implications should be placed in the next section.

Discussion □ The nature and findings of the study are placed in context of other relevant, published data. Subheadings that aid clarity of presentation are encouraged.

Acknowledgments and affiliations □ Reference should be made to availability of detailed data, either through public databases or otherwise, and to availability of materials used for reported investigations. It is generally expected that genomic and similar data should be lodged in appropriate public databases at or before the time of publication. Authors are encouraged to make DNA or cell lines available to other workers. Mutation information: it is recommended that all mutations in any gene be deposited in existing public databases.

References □ In accordance with the Vancouver agreement these are cited by the numerical system and listed in the order cited in the text, not in alphabetical order by authors' names (In the text, the reference number should be given between square brackets on the line, not superscript.) All authors should be listed. Journal titles are abbreviated in accordance with the style of Index Medicus e.g Tomlinson IP, Beck NE, Homfray T, Harocopos CJ, Bodmer WF. Germline HNPCC gene variants have little influence on the risk for sporadic colorectal cancer. J Med Genet 1997;34:39-42.

. Nomenclature □ Genes: For human genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). □ Approved gene symbols may be obtained prior to submission from: □ HUGO Nomenclature Committee (HGNC) □ HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) □ European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) □ Wellcome Trust Genome Campus □ Hinxton, Cambridgeshire □ CB10 1SA, UK □ fax: +44 (0)1223 494 468 □ For mutation nomenclature please use the nomenclature guidelines suggested by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>)

. Figure legends □ View further details on [illustrations and tables](#).

Word count: up to 4000 words. Abstract: should not exceed 250 words. □ Tables/Illustrations: up to six. □ References: up to 50.

Manuscript format

Please note, this instruction is for submission only.

The manuscript must be submitted in Word. PDF format is not accepted.

The manuscript must be presented in the following order: □ 1. **Title page**. □ 2. **Abstract** (or summary for case reports) (note: references not allowed in abstracts or summaries). □ 3. Main text (provide appropriate headings and subheadings as in the journal. We use the following hierarchy: BOLD CAPS, bold lower case, Plain text, Italics). □ 4. Tables should be in the same format as your article (ie Word) and not another format embedded into the document. They should be placed where the table is cited and they must be cited in the main text in numerical order. □ 5. **Acknowledgments, Competing interests, Funding**. □ 6. **Reference list**.

Appendices (these should be Web only files to save space in the print journal; if so, please ensure you upload appendices as Web Only files and ensure they are cited in the main text as such.)

Images must be uploaded as separate files (view further details in Figures/illustrations) All images must be cited within the main text in numerical order.

Do not use the automatic formatting features of your word processor such as endnotes,

footnotes, headers, footers, boxes etc. Please remove any hidden text.

Statistics

Statistical analyses must explain the methods used. □

Style

Abbreviations and symbols must be standard and SI units used throughout except for blood pressure values which are reported in mm Hg. □□Whenever possible, drugs should be given their approved generic name. Where a proprietary (brand) name is used, it should begin with a capital letter. □Acronyms should be used sparingly and fully explained when first used. □□

Figures/illustrations□

Colour images and charges

If you wish to publish colour figures in print you will be charged a fee that will cover the cost of printing. The journal charges authors for the cost of reproducing colour images on all unsolicited articles, see the journal web pages for cost information. Alternatively, authors are encouraged to supply colour illustrations for online colour publication and black and white publication in the print. This is offered at no charge.

Tables

Tables should be submitted in the same format as your article (Word) and not another format embedded into the document. They should appear where the table should be cited, cited in the main text and in numerical order. Please note: we cannot accept tables as Excel files within the manuscript.

If your table(s) is/are in Excel, copy and paste them into the manuscript file.

Tables should be self-explanatory and the data they contain must not be duplicated in the text or figures - we will request that any tables that are longer/larger than 2 pages be uploaded as web only data.□

References

Authors are responsible for the accuracy of cited references: these should be checked against the original documents before the paper is submitted. It is vital that the references are styled correctly so that they may be hyperlinked.

Citing in the text

References must be numbered sequentially as they appear in the text. References cited in figures or tables (or in their legends and footnotes) should be numbered according to the place in the text where that table or figure is first cited. Reference numbers in the text must be given in square brackets immediately after punctuation (with no word spacing)—for example, [6] not [6].

Where more than one reference is cited, separate by a comma—for example, [1, 4, 39]. For sequences of consecutive numbers, give the first and last number of the sequence separated by a hyphen—for example, [22-25]. References provided in this format are translated during the production process to superscript type, which act as hyperlinks

from the text to the quoted references in electronic forms of the article.

Please note, if your references are not cited in order your article will be returned to you before acceptance for correct ordering.

Preparing the reference list

References must be double spaced (numbered consecutively in the order in which they are mentioned in the text) in the [slightly modified] Vancouver style (see example below). Only papers published or in press should be included in the reference list. (Personal communications or unpublished data must be cited in parentheses in the text with the name(s) of the source(s) and the year. Authors should get permission from the source to cite unpublished data.).