

MARIANGES ZADROZNY GOUVÊA DA COSTA

**Freqüência de polimorfismos do gene CFTR em pacientes
portadores de pancreatite crônica alcoólica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientadora: Profa. Dra. Dulce Reis Guarita

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Marianges Zadrozny Gouvêa da

Frequência de polimorfismos do gene CFTR em pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica / Marianges Zadrozny Gouvêa da Costa. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Gastroenterologia clínica.

Orientadora: Dulce Reis Guarita.

Descritores: 1.Pancreatite crônica/genética 2.Alcoolismo 3.Regulador da condutância transmembrana em fibrose cística 4.Polimorfismo genético

USP/FM/SBD-453/07

Para:

meus queridos pais, Karin e Paulo e

meu amado marido Marcelo

Agradecimentos

À Professora Dra Dulce Reis Guarita pelo incentivo constante, orientação, acompanhamento próximo e cuidadoso desta dissertação e, principalmente, pelo exemplo de vida, delicadeza e generosidade;

Ao Professor Dr Flair José Carrilho, Professor Titular da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo apoio e estímulo à pesquisa na pós graduação;

À Professora Dra Suzane Kioko Ono-Nita por ter nos recebido no LIM 7, orientando a realização dos estudos genéticos e acompanhando os resultados no laboratório de Biologia Molecular;

À Dra Ana Cristina de Sá Teixeira pelas inúmeras vezes que me socorreu no decorrer da pesquisa, mas, principalmente, pela amizade, bate papos e cafezinhos que tornam o nosso dia a dia tão mais agradável;

A Jerônimo de Alencar Nogueira pela fundamental contribuição a este trabalho, participando e me ensinando os passos para a realização dos estudos genéticos;

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular, especialmente ao Marcelo Tavares de Souza e à Eliane Pereira do Carmo tanto pela ajuda na coleta de dados, bem como pela assistência no laboratório;

A Helena Paschoale e Marcelo Tavares de Souza pelo auxílio burocrático na solicitação do apoio financeiro para a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

À Dra Denise Cerqueira Paranaguá Vezozzo pela realização cuidadosa das Ultrassonografias Abdominais;

Aos Alcoólicos Anônimos por ter acolhido prontamente a nossa intenção de estudo dos males do alcoolismo e pela participação voluntária de seus integrantes nesta pesquisa;

Ao Professor Dr Aytan Miranda Sipahi pela revisão do projeto de pesquisa e pelas valiosas sugestões;

Ao Dr Marcelo Eidi Nita pela realização da análise estatística, estando sempre acessível, ajudando a compreensão e enriquecendo a discussão deste trabalho e

Aos Drs Odilson Borini, Otávio Galvão Filho, José Manoel de Medeiros, Antônio Carlos Ferreira da Cunha, Luísa Helena Ribas Amaral, Esther Buzaglo Dantas Corrêa, Cíntia Zimmerman de Meireles e Viriato Cunha, preceptores da residência de gastroenterologia

da UFSC, por ter me apresentado à especialidade e por ensinar, não apenas a teoria, mas também o entusiasmo ao praticá-la.

À Alves de Queiroz *Family Fundy for Research* e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Casuística.....	16
3.2 Extração de DNA.....	18
3.3 Reação em Cadeia de Polimerase.....	18
3.4 Seqüenciamento.....	19
3.5 Análise Estatística.....	22
3.6 Estrutura e Apresentação.....	22
4 RESULTADOS.....	23
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	51
7 ANEXO.....	52
8 REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA	Alcoólicos Anônimos
ALT	alanina amino transferase
AMP cíclico	ciclo 3', 5'-(hidrogênio fosfato) adenosina
AST	aspartato amino transferase
°C	graus Celsius
CAPEPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CPRE	Colângiopancreatografia Retrógrada Endoscópica
CREMESP	Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo
CS	controle sadio
Δ F508	deleção do aminoácido fenilalanina na posição 508
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUS	ultrassonografia endoscópica
F	senso ou <i>forward</i>
FA	fosfatase alcalina
FAEEs	ésteres de ácidos graxos de etanol
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

g	grama
G	guanidina
GGT	gama glutamil transferase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC95	Íntervalo de confiança de 95%
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mM	mili molar
N	número
ng/ul	nanograma por microlitro
NP	não pesquisado
OR	Odds ratio
PAN	paciente do grupo A
pb	par de base
PCR	reação em cadeia de polimerase
PRSS1	<i>cationic trypsinogen</i>
R	anti senso ou <i>reverse</i>
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SNPs	polimorfismo de um único nucleotídeo

SPINK1	<i>serine protease inhibitor Kazal type 1</i>
T	timina
TAE	tris-acetato EDTA
TC	Tomografia Computadorizada
TG	timina guanidina
U	unidade
ul	microlitro
UI/l	unidade internacional por litro
uM	micro molar
US	Ultrassonografia
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C
X	vez
<	menor
≤	menor ou igual
=	igual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mutações no gene CFTR em populações de pancreatopatas crônicos de etiologia alcoólica.....	7
Tabela 2 – Distribuição dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C por sexo.....	23
Tabela 3 – Idade dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C.....	24
Tabela 4 – Características raciais dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C.....	25
Tabela 5 – Quantidade e tempo de ingestão de etanol nos grupos A e B.....	26
Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes pertencentes ao grupo A.....	26
Tabela 7 – Distribuição dos grupos A e B segundo os níveis de alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase.....	27
Tabela 8 – Alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A.....	28
Tabela 9 – Distribuição dos grupos segundo os haplótipos mais encontrados.....	32
Tabela 10 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos alelos 5T, 7T e 9T pelo número total de cromossomos.....	33
Tabela 11 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos alelos 10TG, 11TG e 12TG pelo número total de cromossomos.....	34
Tabela 12 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos 5T/7T, 7T/7T e 7T/9T.....	35

Tabela 13 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos 10TG/10TG 10TG/11TG, 10TG/12TG, 11TG/11TG, 11TG/12TG e 12TG/12TG.....	37
Tabela 14 – Distribuição do genótipo 5T/7T segundo a presença de sintomas e/ou complicações nos pacientes do grupo A.....	38
Tabela 15 – Distribuição do genótipo 5T/7T segundo os achados nos exames de imagem dos pacientes do grupo A.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de inclusão de pacientes.....	17
Figura 2 – Seqüência do intron 8 do gene CFTR. Indicadas as posições dos primers senso (F) e anti senso (R) e da região poli T e TG.....	20
Figura 3 – Distribuição por idade dos pacientes dos grupos A, B e C.....	24
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE da PCR do intron 8 do gene CFTR.....	29
Figura 5 – Exemplos de algumas seqüências de haplótipos encontradas.....	30

Resumo

Costa MZG. *Freqüência de polimorfismos do gene CFTR em pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

A dependência de álcool acomete de 10 a 12% da população mundial, estando a associação entre uso abusivo do álcool e pancreatite crônica bem estabelecida. A suscetibilidade pancreática ao álcool é variável e apenas 5 a 10% dos etilistas crônicos desenvolvem pancreatite crônica, sendo o papel dos fatores genéticos neste processo praticamente desconhecido. O gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) codifica proteína que funciona na membrana plasmática de células epiteliais e que tem papel chave na função pancreática exócrina normal, promovendo a regulação, da secreção de fluídos e bicarbonato, importantes para a diluição e a alcalinização do suco pancreático. Quando a função desta proteína é inadequada, observa-se obstrução de pequenos ductos por rolhas protéicas. Várias pesquisas buscam documentar a associação fibrose cística - pancreatite crônica, porém os resultados são conflitantes. Este trabalho pesquisou a freqüência de polimorfismos no trato de politiminas e poli TGs no intron 8 do gene CFTR em pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica. Foram estudados três grupos de pacientes: Grupo A - adultos alcoolistas com diagnóstico de pancreatite crônica; Grupo B - adultos alcoolistas sem pancreatopatia ou cirrose hepática e Grupo C - adultos sadios não alcoolistas. O DNA genômico para análise do gene CFTR foi extraído do sangue periférico, pesquisando-se a freqüência de polimorfismos no trato de politiminas e poli TGs no intron 8. O genótipo 5T/7T foi mais encontrado no grupo A do que no B ($p = 0,0481$), não havendo diferença quando comparados os grupos A e C ($p = 0,1317$). Pacientes com pancreatite crônica por álcool com o genótipo 5T/7T tiveram menor incidência de diabetes melito do que aqueles com outros genótipos ($p = 0,0465$). A combinação de haplótipos 10TG 7T / 11TG 7T foi mais freqüente nos grupos B e C do que no A e poderia, eventualmente, ser um fator protetor contra o desenvolvimento da pancreatite crônica. ($p = 0,0080$ e $0,0162$). Em conclusão, há diferenças no intron 8 do gene CFTR em pacientes com pancreatite crônica alcoólica, quando comparados com alcoolistas não pancreatopatas e indivíduos com o genótipo 5T/7T teriam maior risco de desenvolver pancreatite crônica quando se tornam alcoolistas crônicos.

Descritores: Pancreatite crônica/ genética. Alcoolismo. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Polimorfismos genéticos.

Summary

Costa MZG. *CFTR Polymorphisms in Patients with Alcoholic Chronic Pancreatitis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007.

The alcohol dependence affects from 10 to 12% of the world-wide population, being the association between alcohol abuse and chronic pancreatitis well established. The pancreatic susceptibility to the alcohol is only 5 to 10%, being the paper of the genetic factors practically unknown. The CFTR gene (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) codifies a protein that functions in the epithelial cells and has a role in pancreatic exocrine function, promoting regulation of the secretion of fluids and bicarbonate, important for the dilution and the alcalinization of the pancreatic juice. When the function of this protein is inadequate, blockage of small ducts occurs. Some research regist the association cystic fibrosis - chronic pancreatite, however the results are conflicting. This work searched the frequency of polymorphisms in the polyT and poly TGs tracts in intron 8 of CFTR gene in patients with alcoholic chronic pancreatitis. Three groups of patients have been studied: Group A - adult alcoholics with chronic pancreatitis; Group B - adult alcoholics without pancreatic disease or hepatic cirrhosis and Group C - non alcoholics healthy adults. DNA analysis of CFTR gene was made after extraction from peripheral blood samples. The 5T/7T genotype was more frequently found in group A than in B ($p = 0.0481$), with no difference when compared to group C ($p = 0,1317$). Patients with alcoholic chronic pancreatitis and 5T/7T genotype had less incidence of diabetes mellitus than those with other genotypes ($p = 0,0465$). The haplotype combination 10TG 7T / 11TG 7T was more frequent in groups B and C than in A and it could, eventually, be a protective factor against the development of alcoholic chronic pancreatitis. ($p = 0,0080$ and $0,0162$). In conclusion, we found differences when these three groups are compared and individuals with 5T/7T genotype would have greater risk to develop chronic pancreatitis if they become alcoholics.

Descriptors: Pancreatitis chronic / genetics. Alcoholism. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Polymorphisms genetics.

1 INTRODUÇÃO

A dependência de álcool acomete de 10 a 12 % da população mundial e 11,2% daqueles que vivem nas 107 maiores cidades do Brasil¹, estando a associação entre uso abusivo do álcool e pancreatite crônica bem estabelecida.² No ocidente, o álcool é a causa de 70 a 90% das pancreatites crônicas calcificantes³ e, em nosso meio, a alta prevalência do alcoolismo crônico é responsável por 93,4% das mesmas.⁴

O estudo da fisiopatogenia da doença é dificultado, tanto pela falta de modelos animais experimentais para pancreatite alcoólica, quanto pela demonstração de que o uso abusivo do álcool determina múltiplos efeitos responsáveis pela doença pancreática. Dentre estes, a formação de ésteres de ácidos graxos de etanol (FAEEs), na principal via para o metabolismo do álcool no pâncreas, leva à morte celular por alterações no metabolismo do cálcio, além de estimular a fibrinogênese pelos plasminogênios.⁵

O álcool também aumenta a sensibilidade do pâncreas à resposta inflamatória pela super regulação dos sistemas mediadores da produção de citosinas e de outras moléculas pró inflamatórias (proteína quinase C, fator nuclear κ B, proteína ativadora 1, etc),⁵ além de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que atuam como ativadoras das células estreladas do pâncreas.⁵

No Brasil, de Almeida et al.^{6,7} e Andraus et al.⁸ estudaram modelos experimentais de pancreatite. Os primeiros inicialmente observaram o efeito da hipertermia e, em um segundo trabalho, o efeito de inibidores da ciclooxigenase 2 em modelos de pancreatite aguda induzida por ceruleína e taurocolato.

No trabalho de Andraus et al.⁸, ratos machos Wistar tiveram pancreatite aguda induzida por ceruleína, sendo o objetivo do estudo avaliar o efeito da hipotermia na evolução da pancreatite; a hipotermia levou ao aumento da resposta inflamatória mediada por maior estresse oxidativo.

Estes modelos animais diferem daqueles com pancreatite crônica alcoólica, porém o conhecimento que pode ser adquirido pelo estudo da cascata inflamatória, de seus mediadores, da formação de ROS e de fatores modificadores da sua evolução é de grande valor para o melhor entendimento de uma pancreatite, inclusive daquelas de etiologia alcoólica.^{6,7,8}

A quantidade de etanol considerada crítica para determinar o comprometimento crônico do pâncreas é de cerca de 80 e 100g diários, respectivamente para o sexo feminino e para o masculino, por, em média, seis anos; a lesão do pâncreas depende do teor de álcool ingerido e da predisposição à doença apresentada pelo indivíduo.^{3 4}

A suscetibilidade pancreática ao álcool é variável e apenas 5 a 10 % dos etilistas crônicos desenvolvem pancreatite crônica. Uma possível explicação para isto é a de que o etanol sensibilizaria os indivíduos para a doença pancreática, podendo esta ser desencadeada por fatores ambientais e/ou genéticos, sendo o papel dos fatores genéticos praticamente desconhecido neste processo.²

O estudo de determinantes genéticos para doenças com múltiplos fatores causais é difícil, pois as mesmas resultam da interação de fatores ambientais com múltiplos genes.⁹

Mesmo assim, são crescentes as evidências de que fatores ambientais, associados a cofatores genéticos, devam estar presentes para que a pancreatite crônica por álcool se instale¹⁰.

Para o melhor entendimento dos estudos genéticos realizados, alguns conceitos devem ser entendidos: Classificam-se as diferenças encontradas entre seqüências de DNA de diferentes indivíduos, quanto à formação estrutural, em estudo de microsátélites e pesquisa de polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs).⁹

Microsátélites consistem em múltiplas repetições de uma seqüência curta (ex. TGTGTG...) e os alelos de um microsátélite são diferenciados pelo número de repetições (ex. 11TG indica a presença de 11 repetições de TG).⁹ Alelo é a seqüência do DNA em um determinado local (lócus), genótipo é a determinação do alelo nos dois cromossomos, haplótipo é a determinação de diferentes alelos em um único cromossomo e fenótipo é a manifestação clínica, uma característica ou mesmo uma doença, determinada até certo ponto pelo genótipo.⁹

Polimorfismo indica variabilidade genética em uma determinada localização da seqüência de DNA, existindo diferentes variantes em freqüência significativa na população. SNP é a variação de apenas um par de base e acredita-se que existam cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano.⁹

Trabalhos sobre doenças com múltiplos fatores causais possuem resultados contraditórios e, na maioria das vezes, não são reproduzidos em estudos subseqüentes.¹¹ Isto pode ocorrer por uma série de motivos, como variações entre diferentes populações e grupos étnicos, estudo de apenas um alelo sem considerar os diferentes genótipos e haplótipos, erro na classificação/diagnóstico da doença estudada, estratificação inadequada da população estudada e baixo poder estatístico do resultado encontrado, tanto por uma casuística insuficiente, como pelo fato de que mais de um gene pode contribuir para o mesmo desfecho.¹¹

Estas dificuldades tornam-se maiores quando não são conhecidas as possíveis mutações genéticas responsáveis pela doença ou, mesmo, quando é desconhecida a função do gene estudado.¹¹

No caso da doença pancreática, mutações nos genes CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), PRSS1 (*cationic trypsinogen*) e SPINK1 (*serine protease inhibitor Kazal type 1*) têm sido associadas ao comprometimento crônico do pâncreas.¹²

Desde que foi descoberto, em 1989, mais de 1000 mutações no gene CFTR já foram relatadas; este gene codifica a proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística que funciona na membrana plasmática de células epiteliais como um canal de ânions e como um regulador de outras proteínas transportadoras de íons.¹³

A proteína CFTR tem papel chave na função pancreática exócrina normal; o suco pancreático, inicialmente secretado pelas células acinares, é rico em proteínas e nos ductos pancreáticos a proteína CFTR promove a regulação, pelo AMPcíclico, da secreção de fluídos e bicarbonato, importantes para a diluição e a alcalinização do mesmo.¹³ Quando a função desta proteína é inadequada, observa-se obstrução de pequenos ductos por rolhas protéicas.¹³

A fibrose cística é doença descrita como autossômica recessiva, na qual células epiteliais exibem transporte anormal de íons quando estimuladas; manifesta-se na infância e associa-se a doença pulmonar grave, a má absorção e a uma reduzida expectativa de vida.¹⁴ A mutação $\Delta F508$ é responsável por 50 a 60% dos casos, podendo os mesmos ser homozigotos ou heterozigotos compostos, isto é, com um alelo $\Delta F508$ e outro menos comum (ex: R117H).¹³

Ao longo dos anos, foram identificados pacientes com doença atípica ou monossintomática, manifestada, por exemplo, por bronquite crônica, por pólipos nasais e sinusite crônica ou por azospermia, que leva à infertilidade.¹⁴

Com este amplo espectro de manifestações fenotípicas, indagou-se sobre uma possível associação entre fibrose cística e doença pancreática crônica isolada.¹⁴

Algumas mutações levam a fenótipos mais brandos, tanto em homozigose (ex.5T/5T), como em heterozigose combinada (ex. E217G/A1136T), gerando doença pancreática isolada e, nestes casos, o paciente era diagnosticado como portador de pancreatite crônica idiopática.¹³

É possível que, na presença de determinadas mutações, pacientes heterozigotos, com redução parcial da atividade da proteína, possam desenvolver doença pancreática isolada, quando submetidos a fator de risco ambiental,¹⁵ como, por exemplo, o álcool. A favor desta hipótese, está o padrão histológico do pâncreas em portadores de fibrose cística, com formação de rolhas protéicas nos ductos pancreáticos, semelhantes à da pancreatite alcoólica, além de já ter sido descrita a presença de valores anormais de eletrólitos no suor de pacientes com esta última.¹⁶

Dentre as diversas mutações descritas, optou-se, no presente trabalho, pelo estudo da variante 5T, que consiste em trato curto de politimidinas (5T ao invés de 7 ou 9T) localizada no intron 8. Apesar de estar localizada em região não codificadora do gene, a sua presença inibe a transcrição do exon 9 do gene CFTR em 90% dos homozigotos e em 50% dos heterozigotos. Quanto menor a sequência de T, menor a atividade da proteína.¹³

O estudo do intron 8 é de interesse na investigação de um fator predisponente para a pancreatite alcoólica por ser sua frequência relativamente alta na população em geral, girando em torno de 5%, semelhante ao percentual de risco para o desenvolvimento da pancreatite crônica pela população de etilistas.¹⁷

Optou-se, portanto, pelo estudo do intron 8, tanto pela alta frequência de polimorfismos encontrada na população em geral, bem como pela observação, em estudos anteriores,^{12,18,19,20} de que mutações foram encontradas mais frequentemente em populações não caucasianas, semelhantes à nossa, caracterizada pela multiplicidade racial.

Além do segmento de politimidinas, em contigüidade há o segmento de poli TG, nunca estudado no Brasil em pacientes com pancreatite crônica alcoólica.

Nakamura et al.²¹ investigaram este segmento em pancreatopatas crônicos por álcool e correlacionaram seus resultados com a concentração de bicarbonato do suco pancreático, obtido por CPRE, após injeção de secretina. Desta forma, demonstraram que a presença do alelo 11TG em homozigose se correlacionava à concentração normal de bicarbonato no suco pancreático, ao contrário do que ocorria nos genótipos 12TG/11TG e 12TG/12TG, e concluíram que a presença de polimorfismos neste segmento seria capaz de interferir na evolução da pancreatite crônica alcoólica.

A análise de vários trabalhos que incluem pancreatopatas crônicos por álcool, evidencia resultados conflitantes, metodologia bastante variada e populações caucasianas em sua maioria. (Tabela 1)

Tabela 1 – Mutações no gene CFTR em populações de pancreatopatas crônicos de etiologia alcoólica.

Autores	país	raça	N	CFTR	alelo 5T
Sharer et al., 1998	Inglaterra	Branca	71	8,5%	4,2%
Harber et al., 1999	Austrália	Branca	50	NP	1,9%
Monaghan et al., 2000	EUA	Branca (24%) Negra (74%) Hispânica (2%)	46	6,5%	7,6%
Kimura et al., 2000	Japão	Amarela	31	0,0%	4,8%*
Truninger et al., 2001	Alemanha	Branca	49	10,2%	NP
Gaia et al., 2003	Itália	Branca	21	0%	0%
Bernardino et al., 2003	Brasil	Branca (77,5%) Parda (18,5%) Amarela (4%)	64	4,7%	6,3%
Perri et al., 2003	Itália	Branca	45	8,9%	2,2%
Casals et al., 2004	Espanha	Branca	37	32,4%	4,1%
Fujiki et al., 2004	Japão	Amarela	51	15,7%*	2,0%

FONTE: Sharer N, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. N Engl J Med 1998; 339(10):645-652. Harber PS, et al. Alcoholic pancreatitis and polymorphisms of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis gene. Alcohol Clin Exp Res 1999; 23(3):509-512. Monaghan KG, et al. Mutation analysis of the cystic fibrosis and cationic trypsinogen genes in patients with alcohol related pancreatitis. Am J Med Genet 2000; 94:120-124. Kimura S, et al. Polymorphism of cystic fibrosis gene in japanese patients with chronic pancreatitis. Dig Dis Sci 2000; 45(10):2007-2012. Truninger K, et al. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. Am J Gastroenterol 2001; 96(9):2658-2661. Gaia E, et al. Germline mutations in CFTR and PSTI genes in chronic pancreatitis patients. Dig Dis Sci 2002; 47(11):2416-2421. Bernardino AL, et al. CFTR, PRSS1 and SPINK1 in the development of pancreatitis in brazilian patients. JOP. 2003;4(5):169-177. Perri F, et al. Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, the cationic trypsinogen (PRSS1) gene, and the serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene in patients with alcoholic chronic pancreatitis. Eur J Hum Genet 2003;11(9):687-692. Casals T, et al. Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic pancreatitis? Pancreas 2004; 28:374-379. Fujiki K, et al. Genetic evidence for CFTR dysfunction in japanese: background for chronic pancreatitis. J Med Genet 2004; 41(5): e 55.

* significância estatística ($p < 0,05$)

NP = não pesquisada

Como em nosso meio há grande variedade racial, diferenças em relação a estudos anteriores podem ser encontradas. Além disso, apenas dois estudos utilizaram como população controle etilistas crônicos, porém, em ambos, foram incluídos pacientes com cirrose hepática por álcool.^{17,22}

É importante que se excluam os etilistas com acometimento hepático, pois sendo rara a concomitância pancreatopatia e cirrose hepática, poderia haver fator protetor para o desenvolvimento de pancreatite crônica nos pacientes cirróticos, levando a viés nos resultados da pesquisa. Além disso, controles sadios são fundamentais para a comparação das duas populações.

O objetivo do presente estudo é verificar a frequência de polimorfismos no trato de politiminas e poli TGs localizados no intron 8 do gene CFTR, em portadores de pancreatite crônica alcoólica, com o intuito de identificar possíveis fatores predisponentes para o comprometimento do pâncreas em alcoólatras crônicos.

Com a presente investigação, busca-se conhecer melhor o papel de polimorfismos no gene CFTR para o desenvolvimento da pancreatite crônica alcoólica, avaliar a frequência destes polimorfismos na nossa população e, finalmente, contribuir para o diagnóstico diferencial entre a pancreatite crônica e outras afecções, bem como para um diagnóstico precoce do comprometimento crônico da glândula pancreática, capaz de procurar evitar complicações da doença.

1.1 Objetivo

Verificar a frequência de polimorfismos no trato de politiminas e poli TGs no intron 8 do gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) em pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica, compará-la com a de alcoolistas sem pancreatopatia ou cirrose hepática e com a de adultos sadios não alcoolistas

2 REVISÃO DA LITERATURA

Sharer et al.²³ publicaram estudo com 134 pacientes portadores de pancreatite crônica, 71 de etiologia alcoólica, dois com hiperparatireoidismo, um com hipertrigliceridemia e 60 com doença idiopática. Em todos, foi realizada análise do DNA com pesquisa de 22 mutações no gene CFTR e os resultados foram comparados com os de 600 controles sadios. Dentre as mutações estudadas, foi incluída a pesquisa da variante 5T. Nenhum dos pacientes apresentava mutação em ambos os alelos. Em 18 (13,4%) pacientes foi identificada mutação em um cromossomo, sendo que, destes, seis tinham etiologia alcoólica; quando feita a comparação com a população controle não se observou diferença estatisticamente significativa para o fator etiológico álcool ($p=0,12$).

Harber et al.¹⁷ estudaram 52 pacientes com pancreatite crônica alcoólica, pesquisando a ocorrência da variante 5T nos mesmos e em 50 etilistas sem pancreatite como controles, não sendo observada diferença significativa.

Monaghan et al.¹⁸ seqüenciaram o gene PRSS1 e pesquisaram 40 mutações, incluindo a variante 5T, no gene CFTR, em 46 pacientes com pancreatite crônica por álcool e em 16 pacientes com pancreatites de outras etiologias. Não foram identificadas mutações no gene PRSS1 e no gene CFTR a mutação $\Delta F508$ foi encontrada em 18% dos pacientes pancreatopatas crônicos por álcool caucasianos (N=11), ocorrendo diferença estatisticamente significativa ao se fazer comparação com a sabida frequência de 4% de mutações da população caucasiana saudável. A frequência do alelo 5T na população de etiologia alcoólica foi de 7,6%, não havendo diferença quando comparada com estudos prévios que relataram frequências de 6% para a população sadia africana e de 5% para a caucasiana.

Kimura et al.¹⁹ investigaram uma população japonesa de 47 pacientes com pancreatite crônica (31 de etiologia alcoólica, 14 com doença idiopática e dois com pancreatite familiar) nos quais foram pesquisadas as mutações $\Delta F508$ e R117H e polimorfismos do intron 8. Dos pacientes com etiologia alcoólica, nenhum possuía as mutações $\Delta F508$ e R117H, dois possuíam o genótipo 5T/7T e um o genótipo 5T/9T com uma frequência do alelo 5T de 4,8%, mostrando diferença estatística quando comparados com a população controle sadia.

Truninger et al.²⁴ pesquisaram a presença de 31 mutações do gene CFTR em uma população de 81 pancreatopatas crônicos e em 11 pacientes com pancreatite aguda recorrente. Foram detectadas mutações em cinco dos 49 (10,2%) pacientes com pancreatite crônica por álcool, 2,3 vezes maior do que a esperada para a população geral (4.4%)

Gaia et al.²⁵ incluíram 77 pacientes com pancreatite crônica em estudo de mutações nos genes CFTR e SPINK1; destes, 21 tinham como causa da doença o etilismo crônico e 56 tinham pancreatite idiopática, não tendo sido encontradas mutações nos pacientes com afecção pancreática de etiologia alcoólica.

No Brasil, Bernardino et al.¹² pesquisaram mutações nos genes CFTR, PRSS1 e SPINK1 em uma população de 82 pacientes com pancreatite crônica (64 de etiologia alcoólica, doença idiopática em 16 e pancreatite hereditária em dois) comparados a 200 controles sadios. O trabalho evidenciou mutações no gene CFTR em 9,8% dos pacientes, uma mutação no gene PRSS1 e quatro mutações no gene SPINK1, este último com diferença estatisticamente significativa quando comparado à população sadia, sugerindo que possa representar fator de risco para o desenvolvimento de pancreatite crônica nesta população.

Perri et al.²² analisaram a presença de mutações nos genes CFTR, PRSS1 e SPINK1 em 45 pacientes com pancreatite crônica alcoólica e os compararam com 35 hepatopatas crônicos por álcool, não observando diferenças estatisticamente significativas; neste trabalho, no gene CFTR foram pesquisadas 31 mutações e a variante 5T.

Casals et al.²⁰ realizaram a análise do gene CFTR em 68 pacientes com pancreatite crônica, 37 deles com etiologia alcoólica, sendo encontrada mutação do gene em 40,5% dos casos, não sendo o resultado comparado com uma população controle sem pancreatite.

Fujiki et al.²⁶ estudaram 51 pacientes com pancreatite por álcool, 14 com pancreatite idiopática e 162 controles sadios, nos quais foram pesquisadas 31 mutações do gene CFTR. Foi incluído o estudo do intron 8 e, neste, os tratos de politiminas e de poli TGs, seqüências compostas respectivamente por repetições de timinas e timina-guaninas, foram pesquisados com verificação do haplótipo. Nesta população, foram detectadas as mutações Q1352H ($p=0,015$) e R1453W ($p=0,281$), ambas descritas em japoneses. Em relação ao intron 8, a freqüência do alelo 5T não se mostrou diferente entre as populações, porém o genótipo 12TG/12TG foi mais freqüente na população de pancreatopatas por álcool do que na de controles ($p=0,038$).

Como mencionado anteriormente, Nakamura et al.²¹ investigaram 61 pacientes em tratamento para pancreatite crônica alcoólica. Com o objetivo de verificar a associação entre a concentração de bicarbonato no suco pancreático e a presença de polimorfismo no intron 8, estes pacientes foram submetidos à colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE) após estimulação com injeção endovenosa de secretina. Dos 41 pacientes nos quais foi possível coletar o suco pancreático, 15 tinham baixa concentração de bicarbonato e 26 tinham concentração normal. Após o sequenciamento

do intron 8, verificou-se que, naqueles pacientes com baixa concentração de bicarbonato no suco pancreático, a frequência dos genótipos 11TG/12TG e 12TG/12TG foi maior, o que poderia ter um papel na progressão da doença. Além disso, os pacientes com genótipo 11TG/11TG apresentaram menor frequência da baixa concentração de bicarbonato no suco pancreático, o que poderia ser um fator protetor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de estudo observacional, prospectivo, do tipo caso controle.

O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação e aprovado pela Comissão Ética Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPEPesq).

Todo paciente que preencheu os critérios de inclusão recebeu o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo o mesmo lido, compreendido e assinado antes da coleta de dados. Foi permitido ao paciente retirar seu consentimento a qualquer momento.

Foram objeto de estudo pacientes com as seguintes características:

Grupo A

Pacientes adultos com mais de 18 anos de idade, de ambos os sexos, com história prévia de ingestão de pelo menos 100g de etanol diários, por período mínimo de seis anos, para pacientes do sexo masculino e 80g de etanol diários, por período mínimo de seis anos, para pacientes do sexo feminino; todos tinham diagnóstico de pancreatite crônica obtido por exame de imagem (Ultrassonografia Abdominal e/ou Ecoendoscopia e/ou Tomografia Computadorizada de abdômen e/ou Ressonância Nuclear Magnética de abdômen) que demonstrasse alterações compatíveis com pancreatite crônica ou diagnóstico histológico de pancreatite crônica naqueles pacientes submetidos a procedimento cirúrgico.

Grupo B

Indivíduos adultos com mais de 18 anos de idade, de ambos os sexos, com história prévia de ingestão de pelo menos 100g de etanol diários, por período mínimo de seis anos, para pacientes do sexo masculino e 80g de etanol diários, por período mínimo de seis anos, para pacientes do sexo feminino, com exame de imagem (Ecoendoscopia e/ou Tomografia Computadorizada de abdômen e/ou Ressonância Nuclear Magnética de abdômen) que demonstrasse pâncreas e fígado com morfologias normais .

Grupo C

Indivíduos sadios sem história prévia de alcoolismo (ingestão menor do que 20g de etanol diários para ambos os sexos) e sem sintomatologia clínica sugestiva de pancreatite crônica e/ou cirrose hepática. Este grupo foi composto por doadores de sangue voluntários procedentes do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Todos os pacientes dos grupos A e B foram submetidos a exames laboratoriais (Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase Alcalina (FA), Amilase, Lípase e Sorologias para hepatites virais B e C) e de imagem (Ultrassonografia Abdominal e/ou Ecoendoscopia e/ou Tomografia Computadorizada de abdômen e/ou Ressonância Nuclear Magnética de abdômen); estes dois grupos foram selecionados a partir da população atendida nos Ambulatórios de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP no período de julho de 2005 a julho de 2006.

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- 1) pacientes menores de 18 anos de idade e aqueles sem história prévia de alcoolismo (exceto os do grupo C);

- 2) história duvidosa de alcoolismo (exceto os do grupo C);
- 3) outras causas de pancreatite crônica (ex: anomalias anatômicas, pancreatite hereditária, familiar, fibrose cística, pancreatite tropical);
- 4) presença de sorologias virais positivas;
- 5) diagnóstico de cirrose hepática e
- 6) pacientes que não estivessem de acordo com os termos do Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pacientes selecionados para os grupos A e B foram submetidos a um questionário com indagações sobre dados demográficos, sintomatologia clínica, presença de complicações e quantidade ingerida de álcool, sendo este questionário respondido pelo paciente sem a interferência do pesquisador, podendo ser lido pelo pesquisador.

3.1 Casuística

Do total de 73 pacientes com pancreatite crônica alcoólica do grupo A, cinco foram excluídos da análise, três por diagnóstico duvidoso de doença pancreática alcoólica e dois por sorologias virais positivas, um para hepatite C (VHC) e outro com coinfeção por vírus da hepatite B (VHB) e VHC. Assim, o grupo A foi composto por 68 pacientes (Figura 1).

No grupo B, foram incluídos 83 indivíduos com história de alcoolismo e sem pancreatopatia ou cirrose hepática; destes, 15 foram excluídos, dois por sinais de doença pancreática crônica evidenciados pela Ultrassonografia Abdominal, um por alteração de amilase e lipase, seis por sorologias virais positivas (cinco com VHC e um com VHB),

três com alterações nas enzimas hepáticas (AST, ALT, GGT ou FA), um com alterações ultrassonográficas do parênquima hepático sugestivas de cirrose hepática e dois com história duvidosa de alcoolismo. Obteve-se, portanto, um grupo B composto por 68 indivíduos (Figura 1).

Dos 112 doadores de sangue (Grupo C), um foi excluído por ter história prévia de alcoolismo, um por dificuldades técnicas na tentativa da realização do estudo genético e seis por falta de informações necessárias, totalizando-se 104 indivíduos no grupo C (Figura 1).

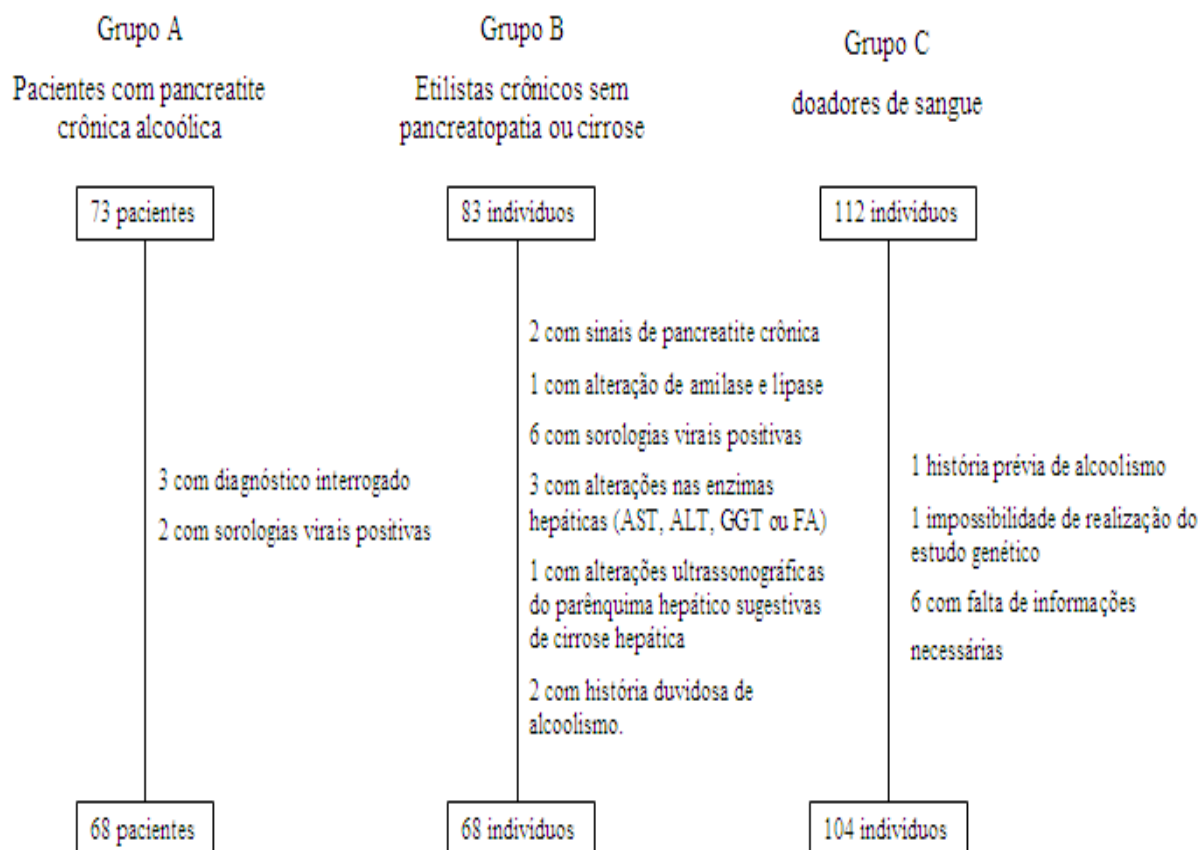


Figura 1. Fluxograma da inclusão de pacientes

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico para análise do gene CFTR foi extraído a partir do sangue periférico, colhido em frascos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e armazenado a -20°C , após centrifugação e separação do creme leucocitário.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.3 Reação em Cadeia de Polimerase

A ampliação por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizou os mesmos *primers* do trabalho de Nakamura et al²¹:

Senso ou Forward (F) 5' **ATGGGCCATGTGCTTTTCAAAC** 3'

Anti senso ou Reverse (R) 5' **CTGAAGAAGAGGCTGTCATCACCA** 3'

Utilizou-se para cada reação Platinum Taq Polimerase em concentração de 1,5 U *primers* senso e antisenso a 0,200 uM, deoxinucleotídeos (dNTP) 200 uM, Magnésio (MgCl_2) 1,5mM, tampão 1X, DNA extraído 5ul e água miliQ autoclavada para completar o volume para 50ul.

Para a ciclagem foi utilizado termociclador (Mastercycler, Eppendorff, Alemanha)

com os seguintes padrões de ciclagem:

- 1) 95°C por cinco minutos;
 - 2) 95°C por 30 s;
 - 3) 60°C por 45 s;
 - 4) 72°C por 45 s;
 - 5) 72°C por cinco minutos.
- } 35 vezes

Os reagentes para a PCR foram adquiridos na Empresa Invitrogen, Carlsbad, Califórnia.

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1,5% em tris-acetato EDTA (TAE). O marcador utilizado foi o Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) em uma quantidade de 4ul.

Todos os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.4 Seqüenciamento

A metodologia para a pesquisa de polimorfismos no intron 8 foi o sequenciamento.

A seqüência a ser estudada foi obtida no Gene Bank (National Center of Biothecnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Figura 2)

5' taatggatc**atgggccatgtgcttttcaaac**taattgtacataaaacaagcatctattgaaa
primer F

atatctgacaaactcatctttttatTTTTga**tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgttttttt**aacag
 poli TG poli T

ggatttggggaattatTTTgagaaagcaaaacaaaacaataacaatagaaaaacttctaa**tggtg**

atgacagcctcttcttcag
primer R

Figura 2. Seqüência do intron 8 do gene CFTR. Indicadas as posições dos *primers* senso (F) e anti senso (R) e da região poli T e poli TG.

Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados 2ul de Big Dye Terminator, Tampão de reação 6ul, *primers* senso ou antisenso a 3,2uM, 1ul, produto do PCR purificado 1,5ul quando utilizado *primer* senso e 2 ul quando utilizado *primer* antisenso e água miliQ autoclavada para completar o volume para 20ul.

Para a ciclagem foi utilizado termociclador (Mastercycler, Eppendorff, Alemanha) com os seguintes padrões de ciclagem:

- | | | |
|---------------------------|---|----------|
| 1) 95°C por dois minutos; | } | 35 vezes |
| 2) 96°C por 10 s; | | |
| R = 01°C por s; | | |
| 3) 50°C por 10 s; | | |
| 4) 60°C por dois minutos; | | |
| 5) Manter 10°C. | | |

Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados os reagentes do Kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1” (Applied Biosystems, Foster City).

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol 95% 100ul (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) homogeneizadas e centrifugadas a 3700 rotações por minuto (rpm) por 45 minutos a 16°C. As amostras precipitadas foram lavadas com etanol 75% 100ul e novamente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 3700 rpm por 30 minutos a 16°C. Removido o etanol, e com a placa seca, foi realizada ressuspensão com 3 ul de *loading buffer*, feito a partir de formamida e *blue dextran* (Applied Biosystems, Foster City) em uma proporção de 5:1.

As amostras foram aplicadas em placas com gel de poliacrilamida Long Ranger (Cambrex, Valais, Suíça) no seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City). No aparelho, as amostras foram submetidas a uma tensão elétrica, migraram por eletroforese para o polo positivo onde uma fonte laser fez a leitura dos nucleotídeos. Os dados gerados foram convertidos em cromatogramas e armazenados no computador acoplado ao seqüenciador (Macintosh®). As seqüências obtidas foram transferidas para um computador e analisadas utilizando o programa *freeware Chromas*® (Copyright © 2003-2007 Technelysium Pty Ltd).

Os estudos genéticos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM 07), pertencente à Disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita.

O Laboratório de Biologia Molecular (LIM 07) já estava equipado com seqüenciador automático e os demais aparelhos necessários para a realização do projeto.

3.5 Análise Estatística

Os dados obtidos do questionário, dos exames de imagem e do estudo genético foram registrados em banco de dados no programas Excel® e submetidos à análise estatística, sendo feitas comparações entre os grupos, a partir dos resultados obtidos. O programa STATA (Stata Corp, USA) foi utilizado para a realização dos testes estatísticos e foi considerado estatisticamente significativo valor de $p \leq 0,05$.

O teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para comparar variáveis categóricas. As variáveis contínuas, quando feita comparação entre mais de dois grupos, foram tratadas com análise de variância.

Foi realizado o cálculo do Odds ratio (OR) e do intervalo de confiança de 95% (IC95) para os resultados cujo valor de p foi $\leq 0,05$.^{27,28,29}

3.6 Estrutura e Apresentação

A estrutura e apresentação do texto desta dissertação basearam-se nas normatizações descritas no Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.³⁰

4 RESULTADOS

Na Tabela 2, encontra-se a distribuição por sexo dos pacientes dos grupos A, B e C,. Verifica-se que nos grupos A e B 86,8% eram do sexo masculino e 13,2% do sexo feminino, enquanto que no grupo C 57,7% eram do sexo masculino e 42,3% do feminino. Foi utilizado o teste do Qui-Quadrado para a comparação dos três grupos, sendo o valor de $p < 0,001$.

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C por sexo

Sexo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	valor de p
Sexo masculino	(59/68) 86,8%	(59/68) 86,8%	(60/104) 57,7%	$p < 0,001^*$
Sexo feminino	(9/68) 13,2%	(9/68) 13,2%	(44/104) 42,3%	$p < 0,001^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* teste do Qui-Quadrado

Da Tabela 3 constam as médias das idades dos pacientes dos grupos A, B e C; a idade média do grupo A foi de 55,8 anos, variando de 37 a 73 anos, no grupo B foi de 50,7 anos com variação de 31 a 71 anos e no grupo C foi de 32,2 anos e com variação de 18 a 70 anos. Para a comparação entre as médias, utilizou-se análise de variância, com valor de $p < 0,001$.

Na Figura 3 está a representação gráfica das médias de idades dos grupos.

Tabela 3 – Idade dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C

Idade (anos)	Grupo A	Grupo B	Grupo C	valor de p
Idade média	55,8 (37-73)	50,7 (31-71)	32,2 (18-70)	$p < 0,001^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Análise de variância entre as médias.

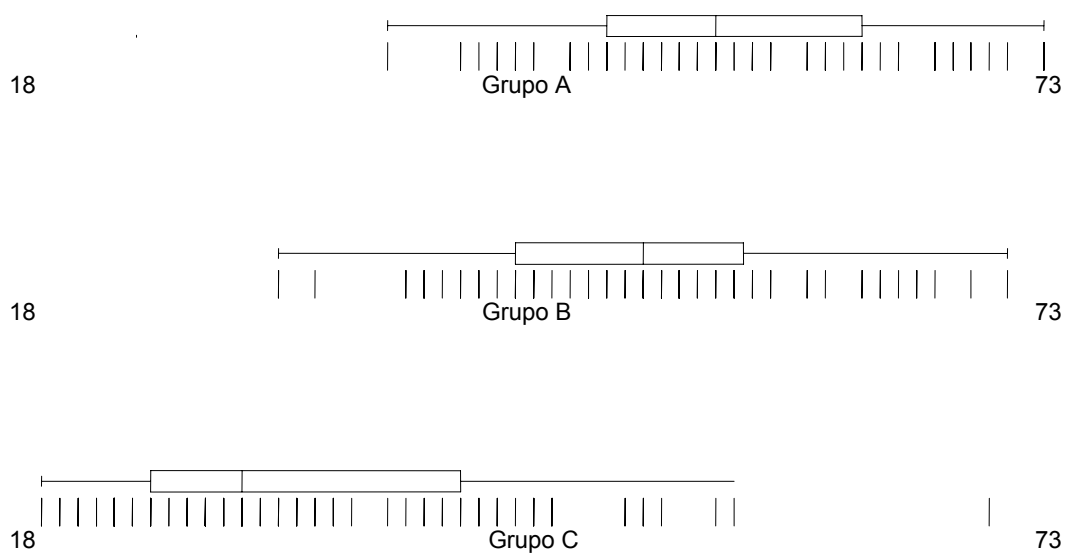


Figura 3. Distribuição por idade dos pacientes dos grupos A, B e C. $p < 0,001$

Na Tabela 4, observa-se a distribuição racial dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C. No grupo A, 54,4% eram da raça branca, 11,7% da raça negra, 32,3% eram pardos e um paciente era oriental. No grupo B, 55,8% eram da raça branca, 14,7% da raça negra, 27,9% eram pardos e um paciente era de origem indígena. No grupo C, 59,6% eram da raça branca, 13,5% da raça negra e 26,9% pardos. O valor de p , quando comparadas todas as variáveis foi de 0,808.

Tabela 4 – Características raciais dos pacientes pertencentes aos grupos A, B e C

Raça	Grupo A	Grupo B	Grupo C	valor de p
Branca	(37/68) 54,4%	(38/68) 55,8%	(62/104) 59,6%	} $p = 0,808^*$
Negra	(8/68) 11,7%	(10/68) 14,7%	(14/104) 13,5%	
Parda	(22/68) 32,3%	(19/68) 27,9%	(28/104) 26,9%	
Amarela	(1/68) 1,5%	(0/68) 0,0%	(0/104) 0,0%	
Indígena	(0/68)0,0%	(1/68) 1,5%	(0/104) 0,0%	

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste exato de Fisher

Da Tabela 5 constam a quantidade e o tempo de ingestão de etanol pelos pacientes dos grupos A e B. No grupo A, a mediana da quantidade de ingestão de etanol foi de 310g de etanol por dia +/- 209,0 e no grupo B foi de 362g de etanol por dia +/-224,5. Foi realizado teste exato de Fisher, com valor de p igual a 0,053. No grupo A, a mediana do tempo de ingestão de etanol foi de 23 anos +/- 10,2 e no grupo B foi de 25 anos +/- 9,3, sendo, na comparação por teste exato de Fisher, o valor de p igual a 0,136.

Tabela 5 – Quantidade e tempo de ingestão de etanol nos grupos A e B

Quantidade e tempo de ingestão de etanol	Grupo A	Grupo B	valor de <i>p</i>
Ingestão de etanol (gramas/dia)	310 +/- 209,0	362 +/- 224,5	<i>p</i> = 0,053*
Duração (anos)	23 +/- 10,2	25 +/- 9,3	<i>p</i> = 0,136*

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

* Teste exato de Fisher

Na Tabela 6, estão descritos os principais sintomas e complicações apresentados pelos pacientes do grupo A. Do total de 68 pacientes, 75% apresentaram dor abdominal, 66,2% emagrecimento, 54,4% diarreia, 30,8% pseudocisto de pâncreas, 60,3% diabetes melito e nenhum apresentava adenocarcinoma de pâncreas.

Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes pertencentes ao grupo A

Sintoma/Complicação	Grupo A
Dor abdominal	(51/68) 75%
Emagrecimento	(45/68) 66,2%
Diarreia	(37/68) 54,4%
Pseudocistos de pâncreas	(21/68) 30,8%
Diabetes melito	(41/68) 60,3%
Adenocarcinoma de pâncreas	(0/68) 0,0%

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica

Da Tabela 7 constam os níveis de alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase dos pacientes dos grupos A e B. A média dos valores de AST no grupo A foi de 39UI/l +/- 46,9 e no grupo B foi de 20UI/l +/- 4,4 com valor de $p = 0,0036$. A média dos níveis de ALT no grupo A foi de 36UI/l +/- 39,5 e no grupo B foi de 27UI/l +/- 8,9, sendo $p = 0,0033$. A média dos níveis de GGT no grupo A foi de 81UI/l +/- 114,4 e no grupo B foi de 32UI/l +/- 21,7 com $p = 0,0117$. A média dos níveis de FA no grupo A foi de 149UI/l +/- 259,3 e no grupo B foi de 77UI/l +/- 22,2, com $p = 0,0418$. A média dos níveis de amilase no grupo A foi de 85UI/l +/- 74,4 e no grupo B foi de 75UI/l +/- 28,8 ($p = 0,3262$). A média dos níveis de lipase no grupo A foi de 82UI/l +/- 197,6 e no grupo B foi de 34UI/l +/- 10,6 ($p = 0,1020$). Para a comparação entre as médias, foi utilizada análise de variância.

Tabela 7 – Distribuição dos grupos A e B segundo os níveis de alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), amilase e lipase

Exame Laboratorial	Grupo A	Grupo B	valor de p
AST (<37 UI/l)	39 +/- 46,9	20 +/- 4,4	$p = 0,0036^*$
ALT (<41 UI/l)	36 +/- 39,5	27 +/- 8,9	$p = 0,0033^*$
GGT(8 – 61 UI/l)	81 +/- 114,4	32 +/- 21,7	$p = 0,0117^*$
FA (40 – 129 UI/l)	149 +/- 259,3	77 +/- 22,2	$p = 0,0418^*$
amilase (28 – 100 U/l)	85 +/- 74,4	75 +/- 28,8	$p = 0,3262^*$
lipase (13 – 60 U/l)	82 +/- 197,6	34 +/- 10,6	$p = 0,1020^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

* Análise de variância entre as médias.

A Tabela 8 salienta as alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A. Entre os mesmos, 39,7% possuíam calcificações parenquimatosas, 11,7% apresentavam dilatação do ducto pancreático principal, 25% tinham tanto calcificações como dilatação ductal e 23,6% possuíam outras alterações.

Tabela 8 – Alterações pancreáticas detectadas por exames de imagem em pacientes do grupo A

Imagem	Grupo A
Calcificações parenquimatosas	(27/68) 39,7%
Dilatação do ducto pancreático principal	(8/68) 11,7%
Calcificações e dilatações	(17/68) 25%
Outras alterações	(16/68) 23,6%

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Na Figura 4 podem ser vistas nove amostras amplificadas e três controles negativos aplicados em gel de agarose 1,5% em TAE. A concentração do produto formado pela PCR foi calculada comparando a sua intensidade com a do marcador Low Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), estimando-se uma concentração de 25ng/ul, com tamanho do fragmento de 200pb.

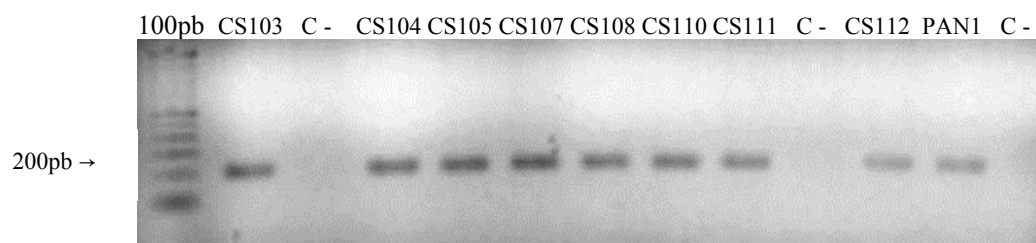


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE da PCR do intron 8 do gene CFTR
 pb = par de base
 CS = controle sadio (grupo C)
 PAN = paciente do grupo A

As 240 amostras seqüenciadas identificaram 24 diferentes combinações de haplótipos na população estudada. Dois possuíam 9TG 9T / 10 TG 9T (0,8%), um possuía 10TG 7T / 9TG 9T (0,4%), vinte e três 10TG 7T / 10TG 7T (9,5%), onze 10TG 7T / 10TG 9T (4,5%), quarenta e dois 10TG 7T / 11TG 7T (17,5%), quatro 10TG 7T / 11TG 9T (1,7%), oito 10TG 7T / 12TG 7T (3,3%), quatro 10TG 9T / 10TG 9T (1,7%), um 10TG 9T / 11TG 9T (0,4%), sete 11TG 5T / 10TG 7T (2,9%), um 11TG 5T / 10TG 9T (0,4%), quatro 11TG 5T / 11TG 7T (1,7%), dois 11TG 5T / 12 TG 7T (0,8%), dezenove 11TG 7T / 10TG 9T (7,9%), cinquenta e dois 11TG 7T / 11TG 7T (21,7%), sete 11TG 7T / 11TG 9T (2,9%), trinta e quatro 11TG 7T / 12TG 7T (14,2%), um 12TG 5T / 11TG 7T (0,8%), um 12TG 5T / 11TG 9T (0,8%), cinco 12TG 7T / 10TG 9T (2,1%), quatro 12TG 7T / 11TG 9T (1,7%), cinco 12TG 7T / 12TG 7T (2,1%), um 13TG 5T / 11TG 7T (0,8%) e um 13TG 5T / 12TG 7T (0,8%). Na Figura 5 estão representados alguns exemplos de seqüências encontradas.

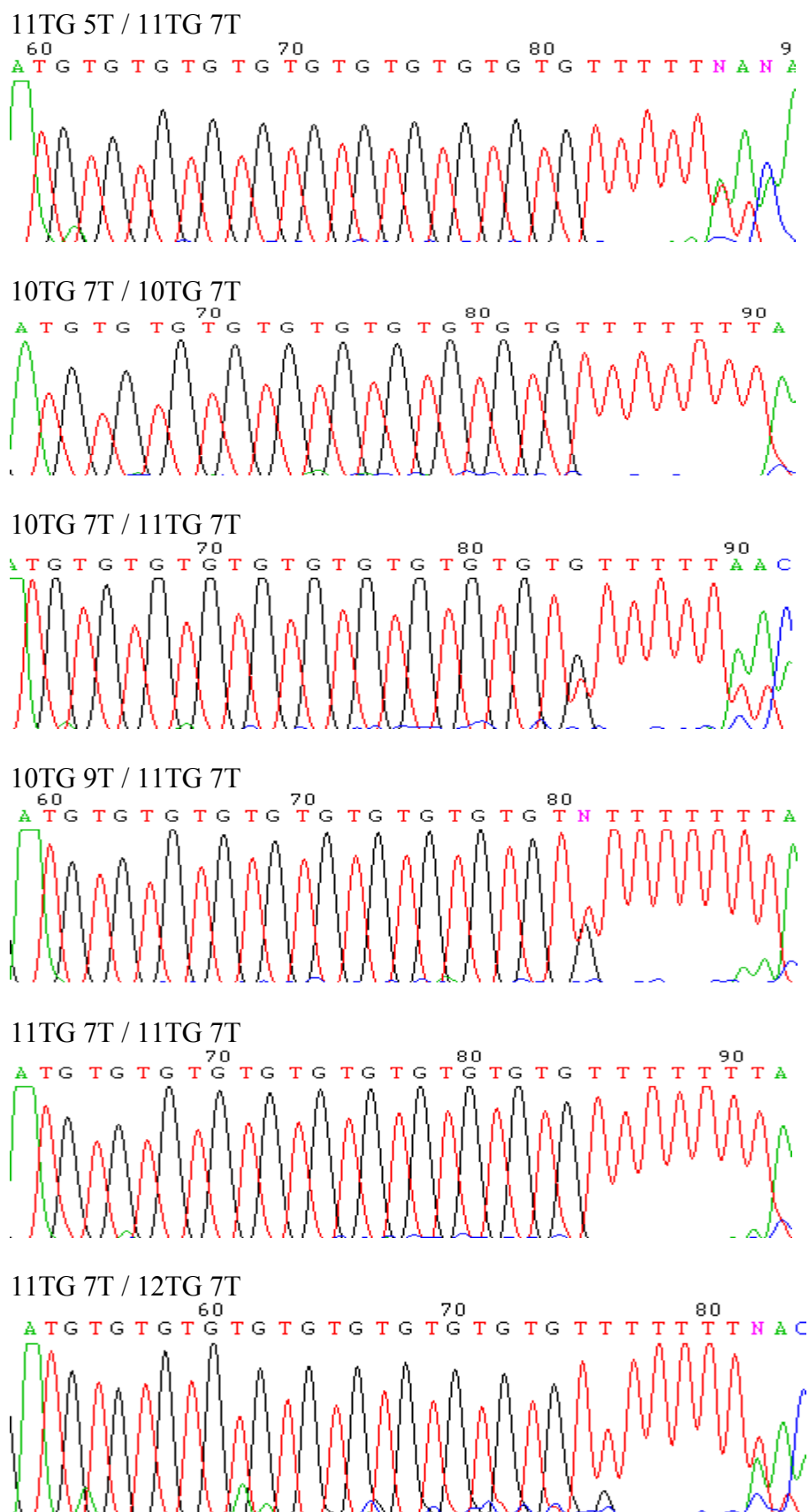


Figura 5. Exemplos de algumas seqüências encontradas

A Tabela 9 apresenta a distribuição das combinações de háplotipos mais frequentes (encontrados em mais de 5% das amostras estudadas) observados nos grupos A, B e C. O háplotipo 10TG 7T / 10TG 7T foi encontrado em 10,3% dos pacientes do grupo A, 10,3% do grupo B e 8,6% do grupo C. Comparando-se os grupos A e B, o valor de p é igual a 1 e comparando-se A e C, p é igual a 0,7184. O háplotipo 10TG 7T / 11TG 7T foi encontrado em 7,3% dos pacientes do grupo A, 23,5% do grupo B e 20,2% do grupo C. Comparando-se os grupos A e B, o valor de p é igual a 0,0080, OR 0,2579, IC 0,0885 – 0,7514 e comparando-se A e C, p é igual a 0,0162, OR 0,3137, IC95 0,1121 – 0,8776. O háplotipo 10TG 9T / 11TG 7T foi encontrado em 11,8% dos pacientes do grupo A, 7,3% do grupo B e 5,8% do grupo C. Comparando-se os grupos A e B, o valor de p é igual a 0,2806 e comparando-se A e C, p é igual a 0,1317. O háplotipo 11TG 7T / 11TG 7T foi encontrado em 23,5% dos pacientes do grupo A, 23,5% do grupo B e 29,4% do grupo C. Comparando-se os grupos A e B, o valor de p é igual a 1 e comparando-se A e C, p é igual a 0,4976. O háplotipo 11TG 7T / 12TG 7T foi encontrado em 14,7% dos pacientes do grupo A, 10,3% do grupo B e 16,3% do grupo C. Comparando-se os grupos A e B, o valor de p é igual a 0,4347 e comparando-se A e C, o valor de p é igual a 0,7772.

Tabela 9 – Distribuição dos grupos segundo as combinações de haplótipos mais encontrados

Combinações de haplótipos	Grupos			valor de p
	A	B	C	entre A e B e entre A e C
10TG 7T / 10TG 7T	(7/68) 10,3%	(7/68) 10,3%	(9/104) 8,6%	$p = 1,0$ e $0,7184^{**}$
10TG 7T / 11TG 7T	(5/68) 7,3%	(16/68) 23,5%	(21/104) 20,2%	$p = 0,0080$ e $0,0162^*$
10TG 9T / 11TG 7T	(8/68) 11,8%	(5/68) 7,3%	(6/104) 5,8%	$p = 0,2806$ e $0,1317^*$
11TG 7T / 11TG 7T	(16/68) 23,5%	(16/68) 23,5%	(20/104) 29,4%	$p = 1,0$ e $0,4976^{**}$
11TG 7T / 12TG 7T	(10/68) 14,7%	(7/68) 10,3%	(17/104) 16,3%	$p = 0,4347$ e $0,7772^{**}$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste exato de Fisher

** Teste do Qui-Quadrado

Na Tabela 10, pode-se observar a distribuição dos grupos A, B e C segundo a frequência dos alelos 5T, 7T e 9T pelo número total de cromossomos. A frequência do alelo 5T é de 5,9%, 2,9% e 2,9% nos grupos A, B e C, respectivamente (p de 0,1883 quando se comparam A e B e 0,1368 na comparação entre B e C). A frequência do alelo 7T é de 76,5%, 84,5% e 84,6% nos grupos A, B e C respectivamente ($p = 0,0919$, quando se comparam A e B e $p = 0,0577$ na comparação entre B e C). A frequência do alelo 9T é de 17,6%, 12,5% e 12,5% nos grupos A, B e C respectivamente, sendo o valor de p igual a 0,2350 quando se comparam A e B e igual a 0,1858 na comparação entre B e C.

Tabela 10 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos alelos 5T, 7T e 9T pelo número total de cromossomos

Alelo	Grupos			valor de p	
	A	B	C	entre A e B	entre A e C
5T	(8/136) 5,9%	(4/136) 2,9%	(6/208) 2,9%	$p = 0,1883$ e $0,1368^*$	
7T	(104/136) 76,5%	(115/136) 84,5%	(176/208) 84,6%	$p = 0,0919$ e $0,0577^{**}$	
9T	(24/136) 17,6%	(26/136) 12,5%	(26/208) 12,5%	$p = 0,2350$ e $0,1858^{**}$	

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste exato de Fisher

** Teste do Qui-quadrado

Da Tabela 11 consta a distribuição dos grupos A, B e C segundo a frequência dos alelos 10TG, 11TG e 12TG pelo número total de cromossomos. A frequência do alelo 10TG é de 35,3%, 34,6% e 34,1% nos grupos A, B e C respectivamente, com p igual a 0,8875 quando se comparam A e B e 0,8230 na comparação entre B e C. A frequência do alelo 11TG é de 50,0%, 53,7% e 49,0% nos grupos A, B e C respectivamente, sendo o valor de p igual a 0,5430 quando se comparam A e B e 0,8624 na comparação entre B e C. A frequência do alelo 12TG é de 12,5%, 11,8% e 15,9% nos grupos A, B e C respectivamente, com p igual a 0,8624, quando se comparam A e B e 0,3864 na comparação entre B e C.

Tabela 11 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos alelos 10TG, 11TG e 12TG pelo número total de cromossomos

Alelo	Grupos			valor de p	
	A	B	C	entre A e B e	entre A e C
10TG	(48/136) 35,3%	(47/136) 34,6%	(71/208) 34,1%	$p = 0,8875$ e $0,8230^*$	
11TG	(68/136) 50,0%	(73/136) 53,7%	(102/208) 49,0%	$p = 0,5430$ e $0,8624^*$	
12TG	(17/136) 12,5%	(16/136) 11,8%	(33/208) 15,9%	$p = 0,8624$ e $0,3864^*$	

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste do Qui-Quadrado

Na Tabela 12, observa-se a distribuição dos genótipos 5T/7T, 7T/7T e 7T/9T nos grupos A, B e C. O genótipo 5T/7T está presente em 11,8% dos pacientes no grupo A, 2,9% no grupo B e 5,8% no grupo C. Quando se compara A com B, o valor de $p = 0,0481$, OR 4,4, IC95 0,8986 – 21,5435 e quando se compara A com C $p = 0,1317$. O genótipo 7T/7T está presente em 58,8% dos pacientes no grupo A, 72,0% no grupo B e 72,1% no grupo C, com valores de p iguais a 0,1048 e 0,0701, respectivamente, ao comparar-se A com B e A com C. O genótipo 7T/9T está presente em 23,5% dos pacientes no grupo A, 22,0% no grupo B e 19,2% no grupo C, com valores de p iguais a 0,8414 e 0,4976 respectivamente, quando compara-se A com B e A com C.

Tabela 12 – Distribuição dos grupos segundo a freqüência dos genótipos 5T/7T, 7T/7T e 7T/9T

Genótipo	Grupos			valor de p	
	A	B	C	entre A e B e	entre A e C
5T/7T	(8/68) 11,8%	(2/68) 2,9%	(6/104) 5,8%	$p = 0,0481$ e	0,1317*
7T/7T	(40/68) 58,8%	(49/68) 72,0%	(75/104) 72,1%	$p = 0,1048$ e	0,0701**
7T/9T	(16/68) 23,5%	(15/68) 22,0%	(20/104) 19,2%	$p = 0,8414$ e	0,4976**

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste exato de Fisher

**Teste do Qui - Quadrado

Na Tabela 13, encontra-se a distribuição dos genótipos 10TG/10TG, 10TG/11TG, 10TG/12TG, 11TG/11TG, 11TG/12TG, 12TG/12TG nos grupos A, B e C. O genótipo 10TG/10TG está presente em 17,6%, 14,7% e 15,4% nos grupos A, B e C respectivamente, com valor de p de 0,6390 quando compara-se A e B e 0,6985 quando compara-se A e C. O genótipo 10TG/11TG está presente em 29,4%, 33,8% e 29,8% nos grupos A, B e C, respectivamente, com valor de p igual a 0,5776, ao ser feita a comparação entre A e B e 1,0, quando compara-se A e C. O genótipo 10TG/12TG está presente em 1,5%, 5,9% e 7,7% nos grupos A, B e C, respectivamente, com valor de p igual a 0,1828, quando compara-se A e B e 0,0690, quando compara-se A e C. O genótipo 11TG/11TG está presente em 26,4%, 29,4% e 24,0% nos grupos A, B e C respectivamente, com valor de p igual a 0,6985, quando compara-se A e B e 0,7184, quando compara-se A e C. O genótipo 11TG/12TG está presente em 17,6%, 14,7% e 19,2% nos grupos A, B e C respectivamente, com valor de p igual a 0,6390, quando compara-se A e B e 0,7913, quando compara-se A e C. O genótipo 12TG/12TG está presente em 2,9%, 1,5% e 1,9% nos grupos A, B e C respectivamente, com valor de p igual a 0,4999, quando compara-se A e B e 0,5176 ao se comparar A e C.

Tabela 13 – Distribuição dos grupos segundo a frequência dos genótipos 10TG/10TG, 10TG/11TG, 10TG/12TG, 11TG/11TG, 11TG/12TG e 12TG/12TG

Genótipo	Grupos			valor de p entre A e B e entre A e C
	A	B	C	
10TG/10TG	(12/68) 17,6%	(10/68) 14,7%	(16/104) 15,4%	$p = 0,6390$ e $0,6985^{**}$
10TG/11TG	(20/68) 29,4%	(23/68) 33,8%	(31/104) 29,8%	$p = 0,5776$ e $1,0^{**}$
10TG/12TG	(1/68) 1,5%	(4/68) 5,9%	(8/104) 7,7%	$p = 0,1828$ e $0,0690^*$
11TG/11TG	(18/68) 26,4%	(20/68) 29,4%	(25/104) 24,0%	$p = 0,6985$ e $0,7184^{**}$
11TG/12TG	(12/68) 17,6%	(10/68) 14,7%	(20/104) 19,2%	$p = 0,6390$ e $0,7913^{**}$
12TG/12TG	(2/68) 2,9%	(1/68) 1,5%	(2/104) 1,9%	$p = 0,4999$ e $0,5176^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

Grupo B = etilistas crônicos sem pancreatite

Grupo C = doadores voluntários de sangue

* Teste exato de Fisher

**Teste do Qui-Quadrado

Na Tabela 14, pode-se observar a distribuição dos pacientes do grupo A com o genótipo 5T/7T e de pacientes também do grupo A, porém com outros genótipos, segundo a presença de sintomas e/ou complicações. Dos pacientes com o genótipo 5T/7T, 87,5% apresentavam dor abdominal em comparação com 68,3% daqueles com outros genótipos ($p = 0,2502$). Dentre aqueles com genótipo 5T/7T, 50% tinham diarreia versus 51,6% daqueles com outros genótipos ($p = 0,6112$). Dentre os pacientes com genótipo 5T/7T, 75% relatavam emagrecimento contra 63,3% daqueles com outros genótipos ($p = 0,4119$). Dentre os pacientes com genótipo 5T/7T, 25% evoluíram com diabetes melito, versus 63,3% daqueles com outros genótipos ($p = 0,0465$, OR 0,193, IC95 0,0357 – 1,0399). Dentre os pacientes com genótipo 5T/7T, 50% apresentaram pseudocistos pancreáticos, em comparação com 26,6% daqueles com outros genótipos ($p = 0,1702$).

Tabela 14 – Distribuição do genótipo 5T/7T segundo a presença de sintomas e/ou complicações nos pacientes do grupo A

Sintoma e/ou complicação	5T/7T	outros genótipos	valor de p
Dor abdominal	(7/8) 87,5%	(41/60) 68,3%	$p = 0,2502^*$
Diarreia	(4/8) 50,0%	(31/60) 51,6%	$p = 0,6112^*$
Emagrecimento	(6/8) 75,0%	(38/60) 63,3%	$p = 0,4119^*$
Diabete melito	(2/8) 25,0%	(38/60) 63,3%	$p = 0,0465^*$
Pseudocisto pancreático	(4/8) 50,0%	(16/60) 26,6%	$p = 0,1702^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

* Teste exato de Fisher

Finalmente, na Tabela 15 pode-se observar a distribuição dos pacientes do grupo A com o genótipo 5T/7T e de pacientes também do grupo A, porém com outros genótipos, segundo os achados nos seus exames de imagem. Dos pacientes com o genótipo 5T/7T, 50% possuíam calcificações pancreáticas contra 43,3% daqueles com outros genótipos ($p = 0,5040$). Dos pacientes com genótipo 5T/7T, 12,5% apresentavam dilatação do ducto pancreático principal versus 11,7% daqueles com outros genótipos ($p = 0,6538$). Tanto nos pacientes com genótipo 5T/7T, quanto naqueles com outros genótipos, a frequência da concomitância de calcificações e dilatações ductais foi de 25% ($p = 0,6476$). Nenhum paciente com genótipo 5T/7T possuía outras alterações, quando comparados com 26,6% daqueles com outros genótipos ($p = 0,1018$).

Tabela 15 – Distribuição do genótipo 5T/7T segundo os achados dos exames de imagem dos pacientes do grupo A

Imagem	5T/7T	outros genótipos	valor de p
Calcificações parenquimatosas	(4/8) 50,0%	(26/60) 43,3%	$p = 0,5040^*$
Dilatação no ducto de Wirsung	(1/8) 12,5%	(7/60) 11,7%	$p = 0,6538^*$
Calcificações e dilatações	(2/8) 25,0%	(15/60) 25,0%	$p = 0,6476^*$
Outras alterações	(0/8) 0,0%	(16/60) 26,6%	$p = 0,1018^*$

Grupo A = pacientes portadores de pancreatite crônica por álcool

* Teste exato de Fisher

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência de polimorfismos do intron 8 do gene CFTR em um grupo de pacientes portadores de pancreatite crônica alcoólica, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia Clínica (Grupo de Pâncreas - A2MG200) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Foi levantada a hipótese de que essa população (grupo A) teria maior frequência de mutações genéticas relacionadas ao gene CFTR do que um grupo de indivíduos submetido ao mesmo fator de risco ambiental, o álcool, mas que não apresentava alteração pancreática (grupo B).

Ocorreu expectativa diferente para o grupo C, pois por não sofrer o impacto do alcoolismo, poderia exibir uma frequência de polimorfismos semelhante ao grupo A sem, no entanto, desenvolver a doença.

O alcoolismo é grave problema social face às repercussões sobre a vida dos indivíduos em sua fase mais produtiva, interferindo na atividade profissional, comprometendo relações pessoais, levando a danos emocionais e financeiros, tanto para o paciente, quanto para seus familiares e pessoas próximas.¹

É também sério problema de saúde pública, pela sua alta frequência e por aumentar o risco para uma série de doenças, dentre elas a pancreatite crônica.^{1,4}

Pode-se indagar por qual razão, apesar de ser o álcool o grande responsável pelo desenvolvimento da pancreatite crônica, somente pequeno percentual de etilistas apresenta comprometimento da glândula pancreática.

Há relatos de que etilistas crônicos de origem africana teriam maior predisposição para a pancreatite crônica do que uma mesma população caucasiana e o inverso é verdadeiro para o acometimento por cirrose hepática.³¹

Como os fatores ambientais não são suficientes para responder a estas perguntas, o foco recai sobre possíveis alterações genéticas.

Como já relatado, a região escolhida para este estudo foi o trato de politiminas e poli TGs no intron 8 do gene CFTR e três grupos de pacientes foram definidos:

- Grupo A, composto por pacientes com pancreatite crônica alcoólica, já em acompanhamento no Grupo de Pâncreas do Ambulatório de Gastroenterologia do HCFMUSP. Após a consulta de rotina, o paciente foi convidado a participar, caso preenchesse os critérios de inclusão. No mesmo dia, foi assinado o termo de consentimento, foi preenchido o questionário, anotaram-se os resultados de exames mais recentes e foi coletado o sangue para o estudo genético. Com esta abordagem, evitou-se a perda de pacientes em um possível seguimento.
- Grupo B, composto por etilistas crônicos sem pancreatopatia ou cirrose hepática, formado a partir de voluntários procedentes dos Alcoólicos Anônimos (AA), com história prévia de alcoolismo e dispostos a participar da pesquisa. Foram incluídas inicialmente 83 pessoas sem sintomas sugestivos de cirrose hepática ou doença pancreática, sendo os mesmos matriculados no ambulatório A2MG-200 para realização dos exames necessários. Destes, 15 foram excluídos e, portanto, o grupo B foi composto por 68 indivíduos.

- Grupo C, composto por doadores de sangue voluntários procedentes do Banco de sangue do HCFMUSP, anteriormente incluídos em outro protocolo de pesquisa*, com os mesmos critérios de inclusão que o estudo atual, já com dados demográficos e clínicos descritos em tabela Excel® e com o DNA extraído pelo mesmo método que o selecionado para o presente estudo.

O desenho do trabalho incluiu estes três grupos para que se pudesse verificar o impacto das mutações genéticas do gene CFTR na presença ou na ausência do fator de risco ambiental (álcool), testando a hipótese de que o desenvolvimento da doença seria multifatorial.

Não há diferença, quanto à distribuição por sexo, entre os grupos A e B, enquanto que no grupo C tal diferença ocorreu ao ser feita a comparação com o grupo A. Isto não invalida a utilização do grupo C na análise, pois o gene CFTR está localizado em cromossomo autossômico; além disso, o intuito da inclusão deste grupo era conhecer o perfil genético da população geral.

Observando-se as médias das idades dos pacientes dos grupos A, B e C, verifica-se que há diferença estatística entre os grupos. Poder-se-ia supor que os pacientes do grupo A evoluíram com pancreatite crônica alcoólica por ser mais velhos e ter tido mais tempo para desenvolvê-la, porém deve-se levar em consideração que o grupo B possuía tempo e volume de ingestão de etanol suficientes para que a lesão pancreática se instalasse anteriormente. Como isto não ocorreu, permanece a possibilidade da existência de um perfil genético “protetor”. A inclusão do grupo C tem como finalidade o conhecimento

* Souza MMT, Ono-Nita SK, Nita ME, Carrilho FJ, Alves VAF, Nogueira JA, Paschoale HS, Carmo EP. (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) Freqüência do alelo mutante UGT1A1*28 em pacientes portadores de hepatite C e em controles sadios, 2007 [em elaboração].

do perfil genético da população geral, perfil este presente desde o nascimento, o que faz com que a diferença de idade neste grupo não interfira na análise.

A distribuição racial entre os três grupos é semelhante.

A ingestão de etanol nos grupos A e B é alta o suficiente para o desenvolvimento de pancreatopatia, sendo que no grupo B (sem doença do pâncreas) chega curiosamente a ser mais alta que no A (pancreatopatas), porém sem diferença estatisticamente significativa. A quantidade ingerida de etanol coincide com aquela encontrada por Cunha et al.³² que investigaram 509 pacientes com pancreatite crônica alcoólica e observaram uma ingestão média diária de 358.6 +/- 282 g por 19.8 +/- 8.8 anos.

Uma hipótese seria que este grupo B, procedente dos AA, bebeu mais por não ter tido repercussões clínicas que o levasse à abstinência alcoólica ou que tivesse geneticamente um fator de proteção contra a agressão pelo álcool.

Fortalecendo esta hipótese, verifica-se que a combinação de haplótipos 10TG 7T / 11TG 7T realmente é mais freqüente, de forma estatisticamente significativa, no grupo B, em relação ao A; mais do que isto, como colocado na introdução, este achado seria um fator genético associado ao ambiental, o álcool, que eventualmente agiria ajudando a impedir o surgimento da pancreatite.

Para definir a existência de associação entre um gene e uma manifestação clínica, Bradford Hill³³ propôs alguns critérios de causalidade. Dentre eles, consta a “força da associação” que pode ser avaliada pelo cálculo do Odds ratio, traduzido para o português como “razão de possibilidades”.

A menor freqüência da variante genética 10TG 7T / 11TG 7T no grupo A, quando comparada com os grupos B e C (OR=0,2579), sugere que a mesma tem menor

associação com a suscetibilidade para pancreatite crônica alcoólica. Em outras palavras, a sua presença protegeria os indivíduos contra a doença.

O grupo A é composto por pacientes na maioria das vezes sintomáticos, que se apresentaram com história de dor abdominal alta típica (75%), muitas vezes com irradiação em faixa, de forte intensidade e descrita como sendo em crises de duração variável. Além disto, muitos referiram emagrecimento (66,2%), episódios de diarreia (54,4%) e a maior parte (60,3%) já apresentava diabetes melito secundário.

Lévy et al.³⁴, na França, investigaram a presença de complicações em portadores de pancreatite crônica, incluindo em seu trabalho 1748 pacientes atendidos por 456 gastroenterologistas. O alcoolismo era a causa da doença em 84% dos casos e os sintomas apresentados pelos pacientes foram dor abdominal (53%), episódios de agudização (67%), pseudocistos (40%), compressão biliar (21%), diabetes melito (32%) e insuficiência exócrina pancreática (36%).

Chen et al.³⁵, na China, pesquisaram as manifestações clínicas de 104 pacientes com pancreatite crônica, nos quais em apenas 27,9% a causa da doença pancreática era o álcool; os sintomas referidos pelos doentes eram dor abdominal (81,7%), emagrecimento (43,3%), esteatorréia (13,5%) e diabetes melito (29,8%).

O achado mais freqüente de má absorção e diabetes melito na presente casuística, quando comparada com as acima mencionadas, caracteriza nossos pacientes como um grupo de portadores de doença pancreática avançada, o que ocorre possivelmente por este ser um serviço de referência para o tratamento e acompanhamento de doenças do pâncreas.

Os resultados dos exames laboratoriais evidenciam que o grupo A possui níveis maiores de aminotransferases, gamaglutamil transpeptidase e fosfatase alcalina do que o

grupo B. Estas enzimas poderiam estar alteradas na pancreatopatia, tanto nos surtos de agudização, situação em que se encontravam dois dos pacientes estudados, como por compressão extrínseca de vias biliares. Estes resultados não firmam o diagnóstico de uma cirrose hepática e, para afastar esta hipótese, foram avaliados também os dados clínicos, o exame físico e os exames de imagem de cada um dos indivíduos.

Os níveis de amilase e lipase tendem a ser maiores no grupo A do que no grupo B, porém sem diferença estatisticamente significativa, o que pode ser esperado pela presença de doença pancreática no grupo A. No grupo B, há dois pacientes com aumento da amilase ($<2X$ o limite superior da normalidade) e com lipase normal, que apresentavam hipertrofia de parótidas ao exame físico e, assim, não foram excluídos do estudo.

Foram verificados os resultados de exames de imagem trazidos pelos pacientes do grupo A. Destes, 65% apresentavam calcificações parenquimatosas, 36,6% apresentavam dilatação do ducto pancreático principal e 23,3% apresentavam outras alterações como heterogeneidade, atrofia do parênquima e/ou outras alterações ductais.

Para confirmar a presença da doença, a associação com sintomatologia típica é imprescindível e estes dados estão de acordo com revisão feita por Ammann³⁶ para o diagnóstico de pancreatite crônica.

Na investigação aqui apresentada, o estudo molecular do gene CFTR evidenciou a existência de uma grande variabilidade genética, tendo sido encontrados 24 diferentes combinações de haplótipos, o que pode decorrer da multiplicidade racial da nossa população; em contraste, Nakamura et al.²¹ detectaram seis haplótipos na população que avaliaram.

O estudo da região poli T do intron 8 do gene CFTR demonstrou maior frequência do alelo 5T no grupo A do que nos grupos B e C, porém sem diferença estatisticamente significativa, resultado este de acordo com aqueles obtidos por Sharer et al.²³, Monaghan et al.¹⁸ e Casals et al.²⁰ que encontraram frequência do alelo 5T maior do que a esperada para a população geral; no entanto, estes estudos mencionados não possuíam grupo controle sem doença pancreática.

Bernardino et al.¹² no Brasil, detectaram a presença do alelo 5T em 6,3% dos cromossomos dos pacientes com pancreatite alcoólica, porém a sua população controle não foi testada para a presença de mutações no gene CFTR.

Kimura et al.¹⁹ em sua pesquisa verificaram maior frequência do alelo 5T na população de pancreatopatas crônicos por álcool quando a mesma foi comparada com controles sadios, sendo esta diferença significativa.

No entanto, nem Haber et al.¹⁷, nem Fujiki et al.²⁶ encontraram diferenças entre a frequência dos alelos 5T, 7T ou 9T quando compararam pancreatopatas crônicos por álcool com grupos controle sem pancreatite.

Observou-se maior frequência do alelo 7T nos grupos B e C em relação ao grupo A, sem diferença estatística significativa. Por não haver tal diferença entre os grupos, poder-se-ia supor que isto se deva à necessidade de aumentar o número de pacientes estudados em cada um dos grupos.

A informação obtida no presente estudo está de acordo com a de Kimura et al.¹⁹ que encontraram uma frequência de 100% do alelo 7T em seus controles contra 87% nos pacientes, sugerindo também um possível fator protetor para o mesmo.

Na pesquisa aqui apresentada, o estudo dos genótipos demonstrou que a presença de 5T/7T se correlaciona à presença de pancreatite crônica por álcool (grupo A),

havendo diferença estatisticamente significativa quando a comparação se dá com o grupo B, mas não quando feita com o grupo C. Diferenças na comparação com o grupo B eram esperadas por se tratar de pessoas expostas a fator de risco ambiental, o álcool, enquanto que o grupo C, composto por doadores voluntários de sangue, reflete o perfil genético da população geral não alcoolista.

Assim, pessoas com este genótipo (5T/7T), mas associado à ingestão de etanol, teriam maior risco para desenvolver pancreatite crônica do que o restante da população. Ao contrário do mencionado em relação aos haplótipos 10TG7T/11TG7T, o genótipo 5T/7T poderia eventualmente ser um facilitador para o surgimento da pancreatite crônica.

Com a verificação do OR, avaliou-se a força da associação entre este perfil genético (5T/7T) e a pancreatite crônica alcoólica, demonstrando-se que a presença de tal genótipo acarretaria uma possibilidade 4,4 vezes maior de desenvolvimento de pancreatite crônica para os etilistas crônicos.

Os dois indivíduos do grupo B que possuem o genótipo 5T/7T não diferem dos demais quanto à quantidade e tempo de ingestão de etanol, além de possuírem exames de laboratório e imagem normais.

Os estudos que analisam o impacto dos genótipos em suas populações são poucos.

Assim, Kimura et al.¹⁹ verificaram que 6,4% de seus pacientes com pancreatite crônica alcoólica possuíam o genótipo 5T/7T contra nenhum de seus controles, diferença esta não significativa.

Na presente investigação, a ocorrência do alelo 12TG não diferiu entre os grupos estudados.

Em estudo de Fujiki et al.²⁶, a presença do genótipo 12TG/12TG foi mais freqüente entre os pacientes do que nos controles.

Além de Fujiki et al.²⁶, Nakamura et al.²¹ descreveram genótipos sem a presença do alelo 12TG como protetores contra a produção reduzida de bicarbonato pelo suco pancreático; no presente trabalho, foi encontrada menor freqüência de pancreatite naqueles indivíduos que possuíam a combinação dos genótipos 10TG/11TG e 7T/7T, caracterizando o haplótipo 10TG 7T / 11TG 7T.

No entanto, o estudo dos diferentes genótipos do segmento poli TG isoladamente não evidenciou diferenças entre os grupos. Aparentemente, diferenças neste segmento possuem maior importância em populações de origem asiática do que na nossa, que possui número muito pequeno de pessoas com tal origem.

A pesquisa do haplótipo define cada cromossomo para as seqüências de poli TG e poli T em contigüidade, sendo importante por verificar o perfil genético dos pacientes para os dois polimorfismos estudados e os separar em cada cromossomo.

A comparação entre os achados clínicos dos pacientes com pancreatite crônica alcoólica que possuem o genótipo 5T/7T com aqueles pacientes que possuem outros genótipos demonstra que a presença deste genótipo não interferiu na evolução dos doentes quanto à presença de dor abdominal, insuficiência exócrina ou desenvolvimento de pseudocistos; no entanto, estes pacientes possuem menor incidência de diabetes melito do que os pacientes sem os genótipos 5T/7T.

Para a avaliação da força da associação deste achado, novamente foi realizado o cálculo do OR cujo valor de 0,193 demonstra correlação inversa entre o genótipo 5T/7T e o desenvolvimento de diabetes melito nos pacientes com pancreatite crônica alcoólica.

Esta constatação sugere que pacientes com presença de mutação no gene CFTR evoluem com menor ocorrência de diabetes melito. Pacientes portadores de fibrose cística, doença que afeta o epitélio, possuem, em sua quase totalidade, comprometimento da glândula pancreática, inicialmente na porção exócrina do órgão. Com o avanço da fibrose glandular, cerca de 10% dos pacientes, independentemente da idade, desenvolvem diabetes melito.³⁷

Gaia et al.³⁸, em uma população de pancreatopatas crônicos com fatores etiológicos diversos, verificaram que a incidência de diabetes melito foi menor nos pacientes com mutação do CFTR do que naqueles com mutações no gene SPINK1 e que a incidência de diabetes melito foi de 31%, semelhante à da presente investigação (25% naqueles pacientes com genótipo 5T/7T).

Poucos estudos correlacionam a presença de mutações genéticas em portadores de pancreatite crônica alcoólica com as características da evolução da pancreatopatia e com as alterações apresentadas pelos pacientes nos exames de imagem. Gaia et al.³⁸ o fizeram, observando que pacientes com pancreatite crônica de diversas etiologias e com mutações no gene CFTR apresentaram maior indicação para tratamento cirúrgico, o que não foi investigado no presente estudo, e maior frequência de calcificações pancreáticas, ao contrário do aqui detectado. Na presente investigação não houve diferença estatística quando foram comparados os achados dos exames de imagem dos pacientes com o genótipo 5T/7T com aqueles dos pacientes com outros genótipos.

Em resumo, a pesquisa aqui apresentada salienta que há diferenças entre o perfil genético dos grupos A, B e C, sendo que a comparação entre pancreatopatas crônicos por álcool (grupo A) e etilistas crônicos não pancreatopatas (grupo B) evidencia que os

primeiros possuem, de forma estatisticamente significativa, maior frequência do genótipo 5T7T do que os segundos ($p=0,048$).

Nota-se, ainda, que o haplótipo 10TG/7T+11TG/7T poderia ser um fator protetor contra o desenvolvimento da pancreatite crônica, também com diferença estatisticamente significativa ($p=0,008$).

Os dados obtidos estão de acordo com a hipótese levantada, porém há necessidade de maior investigação para o completo entendimento da suscetibilidade individual às complicações causadas pelo alcoolismo crônico.

Sugerem-se, a partir destes dados, novos estudos com casuística ampliada, além da necessidade de acrescentar à investigação mais mutações do gene CFTR e incluir outros genes, como o SPINK1 e o PRSS1, que também possam ter seu papel no desenvolvimento da pancreatite crônica alcoólica.

6 CONCLUSÕES

Pela análise de polimorfismos no trato de politiminas e poli TGs no intron 8 do gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), em pacientes alcoolistas portadores de pancreatite crônica (grupo A), em alcoolistas sem pancreatite crônica (grupo B) e em indivíduos sadios não alcoolistas (grupo C), pode-se concluir que:

- 1- a frequência do genótipo 5T/7T no grupo A foi de 11,8%, significativamente maior do que a de 2,9% encontrada nos pacientes do grupo B ($p = 0,048$) e sem diferença estatisticamente significativa quando comparamos com a de 5,8% do grupo C ($p = 0,1317$);
- 2- com a utilização do OR para a comparação da frequência do genótipo 5T/7T entre os grupos A e B, verificou-se uma possibilidade 4,4 vezes maior dos pacientes do primeiro grupo desenvolverem a doença, porém com longo intervalo de confiança, sem diferença significativa;
- 3- a combinação dos haplótipos 10TG 7T / 11TG 7T foi mais freqüente nos grupos B (23,5%) e C (20,2%) do que no grupo A (7,3%), sendo a diferença estatisticamente significativa tanto pelo do teste exato de Fisher quanto pelo cálculo do OR com intervalo de confiança de 95% ($p = 0,008$ e $0,016$ e OR = 0,3137, IC95 0,1121 – 0,8776).

7 ANEXO

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE N: SEXO : masculino feminino
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO N..... APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE N:.....SEXO: masculino feminino
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: N..... APTO:
- BAIRRO:..... CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Frequência de Mutações nos Genes CFTR, PRSS1 e SPINK1 em Pacientes Portadores de Pancreatite Crônica Alcoólica e Controles .”

2. PESQUISADORES: 1) Marianges Z. Gouvêa da Costa, 2)Dulce Reis Guarita.

CARGO/FUNÇÃO 1) Pós Graduada; 2) Médica Assistente.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL 1) CREMESP 114571; 2) CREMESP 21137.

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Gastroenterologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- 1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:** Você está sendo convidado para participar de um estudo que pesquisa doenças no pâncreas que podem ser desencadeadas pelo alcoolismo. Nós decidimos fazer esta pesquisa porque sabemos que somente 5 a 10% das pessoas que sofrem com o alcoolismo desenvolvem doença no pâncreas. Acreditamos, portanto, que estas pessoas têm uma predisposição genética, isto é, uma chance maior de ter a doença pancreática que foi herdada de seus pais. Por isto, vamos estudar se você tem alguma predisposição genética para desenvolver ou ter desenvolvido esta doença.
 - 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Você continuará sendo atendido na rotina normal do ambulatório do Hospital das Clínicas. Se você concordar em participar da pesquisa, será solicitado que responda a um breve questionário. Os exames que serão solicitados são os mesmos realizados de rotina para pacientes do ambulatório. Diferente apenas será a coleta de um pouco mais de sangue (10ml); e este sangue retirado a mais será guardado para o estudo da predisposição genética, que comentamos acima. Para isto, pesquisaremos nele o DNA que mostrará se você tem marcadores que ajudaram você a ter desenvolvido a doença no pâncreas. O DNA faz parte das células de todas as pessoas e é nele que estão escritas as características que nós herdamos dos nossos pais. Ou seja, da mesma maneira que no DNA existem marcadores que mostram se a criança é ou não filha de um casal, existem também marcadores para doenças, isto é, que podem mostrar se a pessoa tem ou não uma chance maior de ter uma doença e, no nosso caso, a doença em questão é a pancreatite crônica. Tudo que será estudado no seu sangue é em relação a pancreatite crônica, para entender melhor a doença e a tratar melhor. Não há procedimentos ou exames experimentais, não será feito nada com você que não seja rotina, habitual.
 - 3. Desconfortos e riscos esperados:** O desconforto é relativo à necessidade de vir para as consultas médicas e exames, que, no entanto, estão exatamente de acordo com a rotina do ambulatório. O risco referente à coleta de sangue é o de formar um hematoma ou mancha roxa no lugar da picada da agulha para a retirada de sangue. Em nenhum momento o seu tratamento será modificado e não será acrescentado qualquer medicamento por causa da pesquisa.
 - 4. Benefícios que poderão ser obtidos:** O conhecimento adquirido neste estudo poderá beneficiar inúmeras pessoas com doenças semelhantes à sua. Com o maior conhecimento sobre a doença, no futuro será possível prevenir o seu surgimento nas pessoas que têm esta predisposição, evitar a sua progressão e possivelmente levar à melhoria no tratamento.
 - 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** Não há procedimentos alternativos, todos os pacientes seguirão o mesmo tratamento já iniciado anteriormente à pesquisa.
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO

1. Toda a equipe de pesquisa estará a sua inteira disposição, a qualquer tempo, para esclarecer qualquer dúvida sobre riscos ou benefícios relacionados à pesquisa. O paciente poderá encontrar a equipe todas as 2as feiras pela manhã no ambulatório de Pâncreas (Gastroenterologia Clínica), localizado no 5º Andar do Instituto dos Ambulatórios do HCMUSP, sala 4B.

 2. O paciente tem toda a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento. O paciente não sofrerá qualquer discriminação. Se optar por retirar seu consentimento para as pesquisas, permanecerá sendo acompanhado pelo Grupo de Pâncreas da Disciplina de Gastroenterologia. Não haverá qualquer prejuízo para o seu tratamento no Hospital das Clínicas. Se decidir sair do estudo, não será preciso declarar o motivo.

 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade: Você tem direito à privacidade. Toda informação obtida neste estudo permanecerá confidencial. Somente o médico e sua equipe sabem que você está participando da pesquisa. O seu nome não será revelado em quaisquer relatórios ou publicações resultantes deste estudo, sem o seu expresso consentimento.

 4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa: Não há possibilidade de danos à saúde decorrentes da pesquisa.

 5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa: Não há viabilidade de indenizações.
-

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO
ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Se você tem qualquer dúvida sobre seu tratamento ou seus direitos como um paciente da pesquisa durante ou após o estudo, você pode entrar em contato com *Dra. Marianges Z. Gouvêa da Costa*, no telefone 30697830.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20.....

ASSINATURA DO SUJEITO DA PESQUISA
(ou responsável legal)

ASSINATURA DO PESQUISADOR
(carimbo ou nome legível)

ASSINATURA DA TESTEMUNHA
(caso necessário)

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA
DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA

QUESTIONÁRIO

1- DADOS DEMOGRÁFICOS

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____.

Sexo: ()Feminino
()Masculino

Estado civil: ()Solteiro
()Casado ou União Estável
()Separado
()Viúvo

Raça: ()Branca
()Preta
()Amarela
()Parda
()Indígena

Escolaridade: ()Sem instrução
()Alfabetização de adultos
()Ensino Fundamental – Primeiro grau.
()Ensino médio – Segundo grau.
()Superior.

2- SINTOMATOLOGIA CLÍNICA:

Você apresenta algum dos sintomas ou complicações abaixo relacionados?

()Dor abdominal ()Diabetes
()Diarréia ()Pseudocisto de pâncreas
()Emagrecimento ()Câncer de pâncreas
()Hemorragia Digestiva ()Outro. Qual? _____

3- COMORBIDADES:

Você possui o diagnóstico de alguma das seguintes doenças?

()Pressão Alta ()Hepatite por vírus
()Doença Cardíaca ()Doença Psiquiátrica
()Doença Pulmonar ()Doença Neurológica
()Cirrose Hepática ()Outro. Qual? _____
()Hepatite alcoólica

4- INGESTA ALCOÓLICA:

Você toma ou já tomou bebida alcoólica?

()Sim ()Não

Qual o tipo de bebida que você consome ou consumia?

()Aguardente
()Uísque
()Vodca
()Conhaque
()Vinho
()Cerveja
()Outra Qual? _____

Qual a quantidade ingerida por dia?

Número de copos pequenos (100ml) _____

Número de copos de tamanho normal (200ml) _____

Número de garrafas (750ml) _____

Outra quantidade? Especifique: _____

Durante quanto tempo você ingeriu bebida alcoólica? _____

8 REFERÊNCIAS

1. Marques ACPR, Ribeiro M. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2002; 1-20.
2. Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* 2003; 52:1-25.
3. Buscail L. New insights in idiopathic pancreatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27(4):391-3.
4. Mott CB, Guarita DR. Pancreatite Crônica. In: Cordeiro F. (eds). *Conduitas em Gastroenterologia*. São Paulo: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2004. 632-4p.
5. Pandol SJ, Raraty M. Pathobiology of alcoholic pancreatitis. *Pancreatology* 2007; 7:105-114.
6. de Almeida JL, Jukemura J, Sampietre SN, Patzina RA, da Cunha JE, Machado MC. Effect of hypertermia on experimental acute pancreatitis. *Arq Gastroenterol* 2006; 43(4):316-20.
7. de Almeida JL, Jukemura J, Coelho AM, Patzina RA, Machado MC, da Cunha JE. Inhibition of cyclooxygenase-2 in experimental severe acute pancreatitis. *Clinics* 2006; 61(4):301-6.
8. Andraus W, Jukemura J, Dutra F, Bechara E, Cunha JE, Leite KR, Machado MC. Oxidative stress is enhanced by hypotermia imposed on cerulein-induced pancreatitis in rats. *Clinics* 2007; 62(4):483-90.
9. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005; 366:941-51.
10. Hanck C, Schneider A, Whitcomb DC. Genetic polymorphisms in alcoholic pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(4):613-23.

11. Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003; 361:865-72.
12. Bernardino AL, Guarita DR, Mott CB, Pedroso MRA, Machado MCC, Laudanna AA, Tani CM, Almeida FL, Zatz M. CFTR, PRSS1 and SPINK1 in the development of pancreatitis in brazilian patients. *JOP*. 2003;4(5):169-177.
13. Cohn JA, Mitchell RM, Jowell PS. The role of cystic fibrosis gene mutations in determining susceptibility to chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2004; 33:817-21.
14. Bruno MJ. Current insights into the pathogenesis of acute and chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36 Suppl 234:103-108.
15. Whitcomb DC. Value of genetic testing in the management of pancreatitis. *Gut* 2004;53:1710-1717.
16. Truninger K, Ammann RW, Blum HE, Witt H. Genetic aspects of chronic pancreatitis: insights into aetiopathogenesis and clinical implications. *Swiss Med Wkly* 2001; 131:565-574.
17. Haber PS, Norris MD, Apte MV, Rodgers SC, Norton ID, Pirola RC, Roberts-Thomson IC, Wilson JS. Alcoholic pancreatitis and polymorphisms of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis gene. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23(3):509-512.
18. Monaghan KG, Jackson CE, Kukuruga DL, Feldman GL. Mutation analysis of the cystic fibrosis and cationic trypsinogen genes in patients with alcohol related pancreatitis. *Am J Med Genet* 2000; 94:120-124.

19. Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Yutsudo Y, Kasuga M. Polymorphism of cystic fibrosis gene in japanese patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45(10):2007-2012.
20. Casals T, Aparisi L, Costa CM, Gimenez J, Ramos MD, Mora J, Diaz J, Boadas J, Estivill X, Farré A. Different CFTR mutational spectrum in alcoholic and idiopathic chronic pancreatitis? *Pancreas* 2004; 28:374-379.
21. Nakamura Y, Ohmori T, Ishikawa A, Kobayashi Y, Imazeki H, Higuchi S, Maruyama K. Homozygous (TG)11 allele in Intron 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene has a protective role against bicarbonate decrease in pure pancreatic juice among japanese male alcoholics. *Intern Med* 2004; 43:1131-1137.
22. Perri F, Piepoli A, Stanziale P, Merla A, Zelante L, Andriulli A. Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, the cationic trypsinogen (PRSS1) gene, and the serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) gene in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(9):687-92.
23. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339(10):645-652.
24. Truninger K, Malik N, Ammann RW, Muelhaupt B, Seifert B, Müller HJ, Blum HE. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(9):2658-2661.

25. Gaia E, Salacone P, Gallo M, Promis GG, Brusco A, B C, Carlo A. Germline mutations in CFTR and PSTI genes in chronic pancreatitis patients. *Dig Dis Sci* 2002; 47(11):2416-2421.
26. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet* 2004; 41(5): e 55.
27. Bhopal RS. *Concepts of Epidemiology: an integrated introduction to the ideas, theories, principles, and methods of epidemiology*. New York: Oxford University Press; 2002. p.98-133.
28. Engels EA, O'Brien TR. Epidemiological methods for studies of genetic factors that influence infectious diseases. In: Carrington M, Hoelzel AR. *Molecular Epidemiology: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press; 2001. p.01-27.
29. Greenberg RS, Daniels SR, Flanders WD, Eley JW, Boring JR. *Medical Epidemiology*. 3rd ed. New York: Lange Medical Books; 2001. p.91-140.
30. da Cunha AC, Freddi AJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP; 2005.
31. Whitcomb DC. Genetic predisposition to alcoholic chronic pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27(4):321-326.
32. Cunha RM, Mott CB, Guarita DR, Pedroso MR, Jukemura J, Bacchela T, Cunha JE, Machado MC, Laudanna AA. Complications of chronic pancreatitis in São Paulo (Brazil). *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1997;52(6):306-15.

33. Hill AB. (1965). Proc R Soc Med, volume 58, 295.
34. Lévy P, Barthet M, Mollard BR, Amouretti M, Marion-Audibert AM, Dyard F. Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30(6-7):838-44.
35. Chen WX, Zhang WF, Li B, Lin HJ, Zhang X, Chen HT, Gu ZY, Li YM. Clinical manifestations of patients with chronic pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreas Dis Int* 2006;5:133-137.
36. Ammann RW. Diagnosis and management of chronic pancreatitis: current knowledge. *Swiss Med Wkly* 2006; 136:166-174.
37. Vantghem MC, Moussaïd-Guennoun R, Perimenis P, Marcelli-Tourvieille S, Perez T, Wallaert B. Cystic fibrosis diabetes in adult. *Ann Endocrinol (Paris)* 2005 Sep;66(4):347-54.
38. Gaia E, Salacone P, Salmin P, Brusco A, Bacillo E e Arduino C. Differences in clinical manifestations in patients with chronic pancreatitis and mutations of CFTR, SPINK1 e PRSS1 genes. *JOP* 2004; 6(5):521.