

Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética de característica autossômica recessiva com alta incidência em populações eurodescendentes (1: 2.500 nascidos vivos). Essa doença é identificada através da triagem neonatal ainda em fase assintomática pelo rastreamento do nível de tripsina imunorreativa (IRT), que se encontra elevada em recém-nascidos fibrocísticos, seguida da dosagem dos níveis de cloro presentes no suor.

O gene da FC transcreve uma proteína transmembranar reguladora do transporte iônico (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance* - CFTR) de íons cloreto através do epitélio (Fig.1). O gene *CFTR* possui 27 éxons, ao longo dos quais cerca de 2.000 mutações já foram identificadas, a maioria delas com frequências muito baixas e próprias de determinadas populações. Duas regiões polimórficas, (TG)m e (T)n, localizadas no íntron 8 (IVS8) tem demonstrado afetar a eficiência do *splicing* do éxon 9. Estudos demonstram que baixas repetições (T) e altas repetições (TG) resultam em baixa transcrição do gene, com consequente diminuição da síntese de proteínas CFTR funcionais.

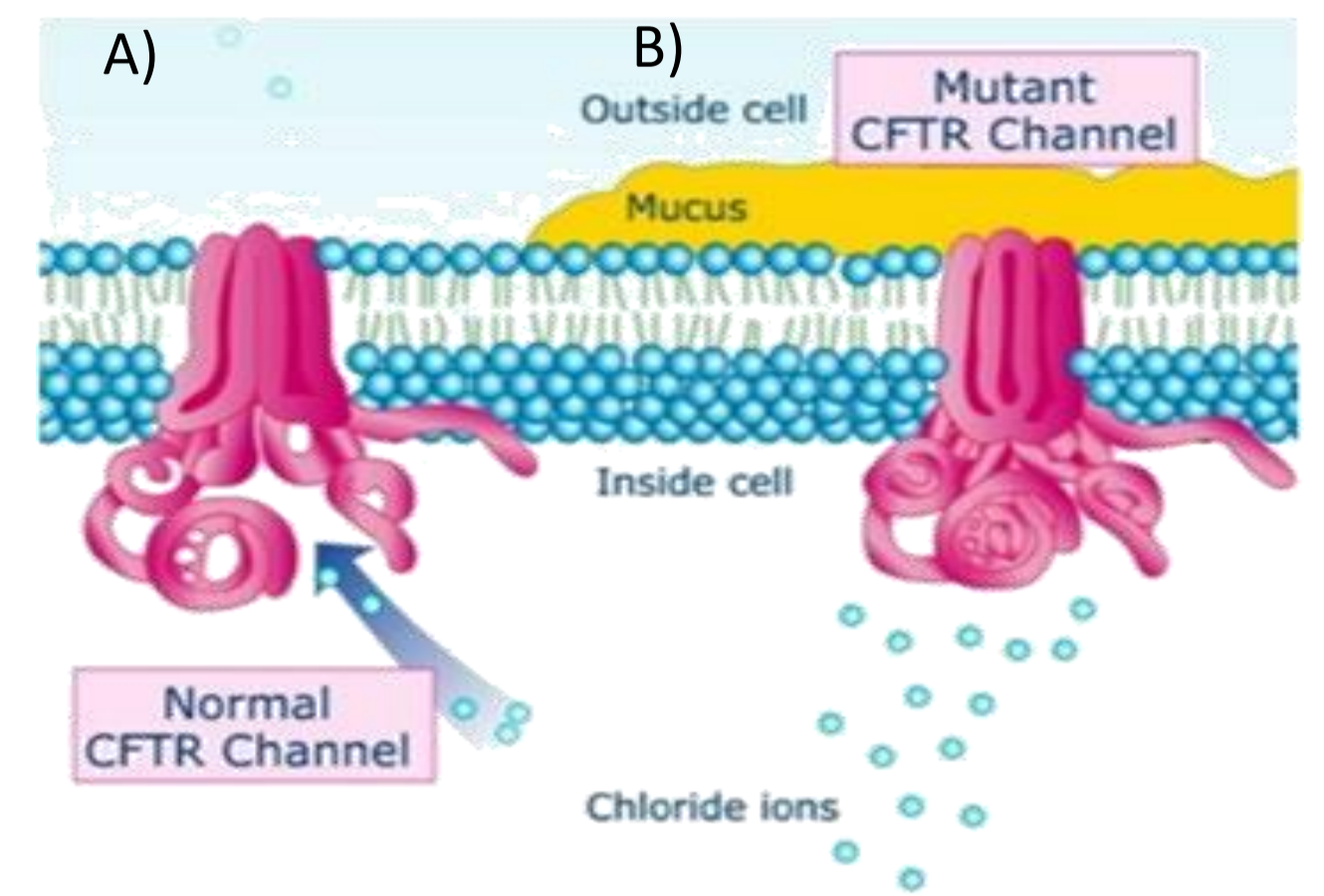


Fig. 1: Proteínas CFTR normal (A) e mutada (B)

Objetivo

Correlacionar o número de repetições (TG) e politiminas (T) na região polimórfica IVS8-(TG)m(T)n com os níveis de cloro no suor, as dosagens de IRT e os genótipos de recém-nascidos triados pelo SRTN/RS.

Materiais e Métodos

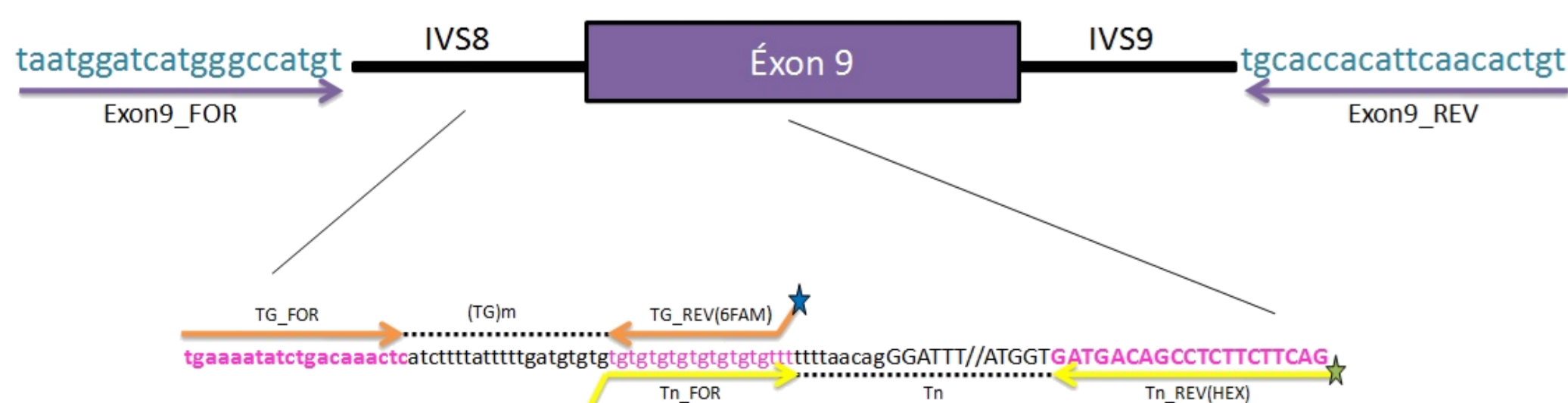
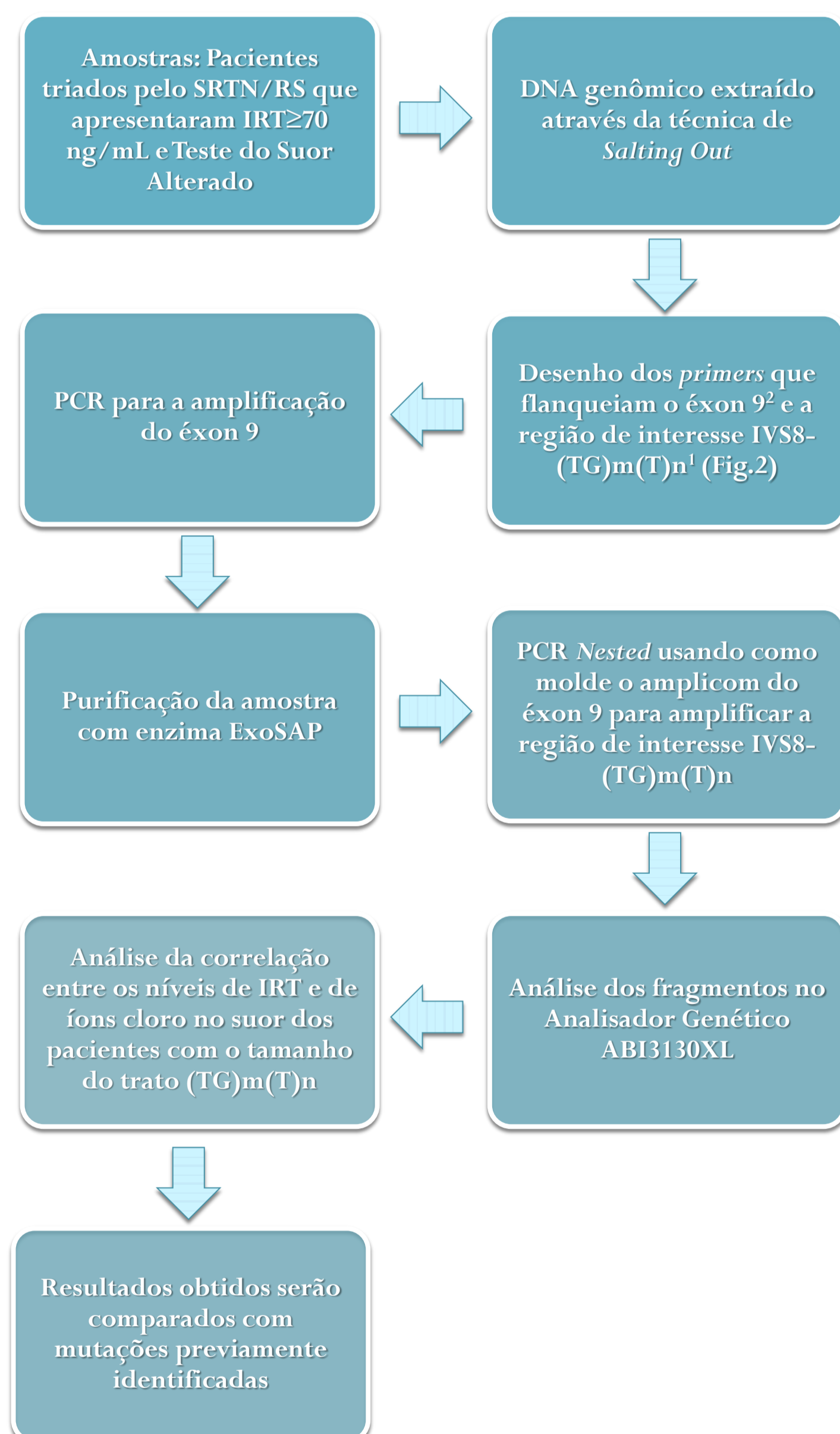


Fig.2 : Posição dos primers para a amplificação do éxon 9 e para a realização do PCR Nested

Resultados

Até o momento foram selecionados 42 pacientes que apresentaram os níveis de tripsina imunorreativa (IRT) superiores a 70 ng/mL e/ou teste do suor alterado. Já foram realizadas as extrações do DNA genômico através da técnica de *Salting Out* e a quantificação do DNA extraído foi realizada em espectrofotômetro *Eppendorf BioSpectrometer basic™*.

Foram desenhados *primers* que flanqueiam a região do éxon 9 e *primers* internos marcados com fluorescência (6FAM e HEX) que flanqueiam a região polimórfica de interesse IVS8-(TG)m(T)n (Fig.2).

Também já foram padronizadas as amplificações do éxon 9 (fragmento de 558 pb) e do trato (T)n (PCR interno) (Fig.3).

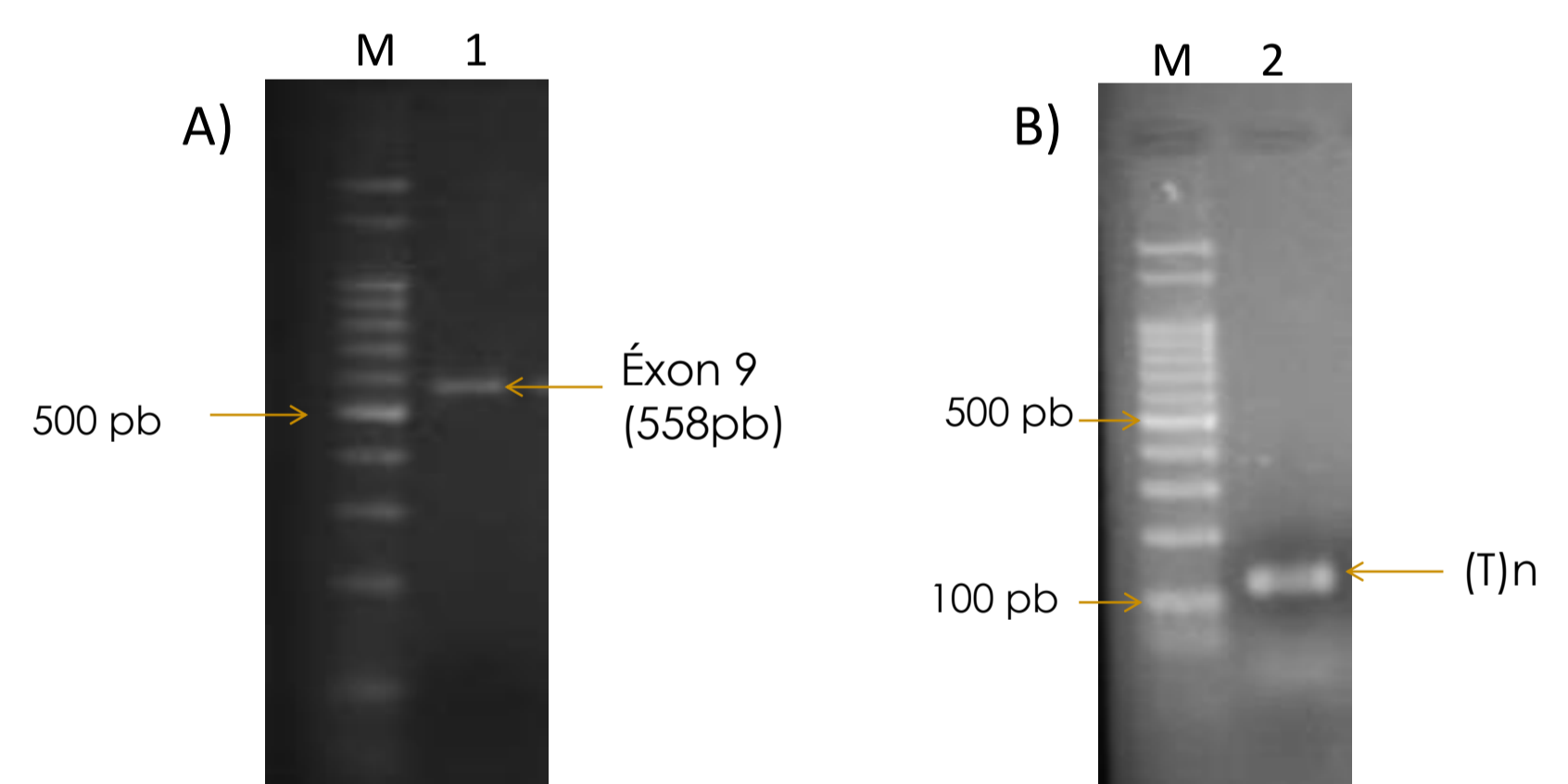


Fig.3: Amplificação do éxon 9 (A) e do trato (T)n (B). M – Marcador molecular de 100 pb, 1 – amplificação do éxon 9, 2 – amplificação do trato (T)n previamente purificado com enzima ExoSAP

Perspectivas

- ✓ Padronizar a amplificação do trato (TG)m
- ✓ Analisar os fragmentos (T)n, (TG)m e (TG)m(T)n no Analisador Genético ABI3130XL
- ✓ Comparar resultados obtidos com mutações previamente identificadas e que há registros na literatura de correlação com o *splicing* deficiente do éxon 9 na presença de polimorfismos na região de interesse IVS8-(TG)m(T)n
- ✓ Correlacionar os níveis de IRT e íons cloro no suor com as repetições (TG)m(T)n

Referências

- ¹Corinne Bareil, Caroline Guittard, Jean-Pierre Altieri, Carine Templin, Mireille Claustres and Marie des Georges: Comprehensive and Rapid Genotyping of Mutations and Haplotypes in Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens and Other Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Disorders, 2007
- ²Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC: Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, 1991

Apoio

Decit/SCTIE/MS, FAPERGS, SES/RS e BIC/UFRGS