

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**ESTUDOS MOLECULARES EM
PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA
DO SUL DO BRASIL**

Carla Streit

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, agosto de 2003.

*Ao meu pai, Claudionor Streit,
que sempre investiu e acreditou na
minha formação profissional e,
principalmente, pessoal.*

“A busca constante e ordenada pelo saber nos gratifica com o título maior de eterno aprendiz”.

J.C.B. Wagner

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Giugliani, pela confiança e oportunidade.

À Dr^a Maria Luiza Pereira pela orientação em todas as etapas da realização deste trabalho, e sobretudo, pela sua amizade incessante.

Ao Serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em especial ao Dr. Fernando de Abreu e Silva e sua equipe pelo apoio e orientação.

Aos pacientes e seus familiares pela colaboração e adesão.

À Associação Gaúcha de Assistência à Mucoviscidose (AGAM) pela prontidão sempre dedicada.

Ao Antônio Carlos Burlamaque Neto que muito me auxiliou na realização deste trabalho.

Ao acadêmico de medicina Haley Calcagnotto, pelo auxílio na análise dos achados clínicos.

Ao grupo de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica (SGM) pela amizade.

À todos os funcionários, professores e bolsistas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo convívio e amizade.

À Dr^a Ann Harris e a equipe do *Institute of Molecular Medicine John Radcliffe Hospital* de Oxford, pela acolhedora receptividade.

Às fontes financiadoras de pesquisa CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA.

Ao João Patrício Herrmann, pelo apoio e amizade.

À minha família e aos meus amigos pelo carinho e compreensão.

Ao João Carlos Wagner pelo companheirismo infindável e pelo exemplo de força e mérito.

Enfim, agradeço a todos aqueles que tornaram seus, os meus objetivos de realização deste trabalho e obtenção deste título.

SUMÁRIO

	Pg.
Resumo	I
Abstract	III
Lista de figuras	V
Lista de tabelas	VI
Abreviaturas	VII
1. Introdução	1
1.1- Fibrose Cística (FC)	2
1.2- Contexto histórico	2
1.3- Aspectos moleculares	4
1.3.1- Mapeamento e identificação do gene da FC	4
1.3.2- Estrutura molecular do gene	5
1.3.3- RNA mensageiro e a proteína CFTR	6
1.3.4- A mutação $\Delta F508$	8
1.3.5- Outras Mutações Descritas	9
1.3.6- As mutações e a heterogeneidade populacional	11
1.3.7- Genética de populações da FC	13
1.4- Manifestações clínicas	13
1.5- Correlação entre genótipo e fenótipo	17
1.6- Aspectos bioquímicos e fisiológicos	23
1.7- Fibrose Cística no Brasil	24
1.8- Diagnóstico de FC	25
2. Justificativa	30
3. Objetivos	32
4. Resultados	34
4.1- Artigo I: CFTR Gene: Molecular analysis in patients from South Brasil	35
4.2- Artigo II: Molecular analysis of a variable length polythymidine tract in the CFTR gene of cysitic fibrosis from south Brasil	41

	Pg.
5. Discussão	61
5.1- Introdução	62
5.2- Análise da amostra	62
5.3- A heterogeneidade populacional brasileira	62
5.4- Idade de diagnóstico de FC no Rio Grande do Sul	63
5.5- Frequência das mutações	64
5.6- Correlações genótipo-fenótipo	67
5.7- Fatores epigenéticos envolvidos na patologia de FC	68
5.8- Diagnóstico molecular de FC	71
5.9- Limitações do protocolo utilizado	71
5.10- Considerações finais	72
5.11- Perspectivas futuras	74
6. Conclusões	75
7. Referências bibliográficas e informações eletrônicas	77
8. Anexos	92
8.1- Caracterização da população estudada	93
8.1.1- Coleta e armazenamento das amostras	94
8.1.2- Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>)	95
8.2.1- Protocolo laboratorial	96
8.2.2- Extração de DNA genômico a partir de sangue	100
8.2.3- Purificação do DNA extraído	102
8.2.4- Amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	103
8.2.5- Análise dos produtos amplificados em gel de agarose	109
8.2.6- Análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP ou SSCA)	110
8.2.7- Digestão com enzimas de restrição	113
8.2.8- Fundamentação da detecção de mutações com endonucleases de restrição	115
8.2.9- Análise estatística	117
8.3- Resultados	118
8.3.1- Exemplificação da amplificação do exon 7 por PCR	118

	Pg.
8.3.2- Exemplificação da análise do exon 7 por SSCP	119
8.3.3- Exemplificação da análise do exon 4 por seqüenciamento direto de dna do gene CFTR (detecção da mutação R117H)	120
8.4- Ficha clínica do paciente	121

RESUMO

Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é uma das doenças hereditárias mais comuns em caucasóides, com uma frequência estimada em um caso em cada 2000 nascimentos sendo a frequência de indivíduos portadores estimada em 5% em indivíduos. Esta doença caracteriza-se principalmente por infecções e obstrução crônica do aparelho respiratório, insuficiência pancreática exócrina e suas conseqüências nutricionais e por elevados níveis de eletrólitos no suor. A apresentação clínica, a gravidade da doença e a velocidade de progressão da FC variam consideravelmente, incluindo-se entre as manifestações a agenesia congênita de vasos deferentes (ACVD). Dentre as 1006 mutações associadas à FC, a R117H foi descrita em associação com um sítio polimórfico de timidinas no intron 8 do gene CFTR, a qual pode estar relacionada a ACVD.

Este trabalho teve como objetivos: ① identificar alterações nas seqüências de nucleotídeos dos exons 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 19, 20 e 22 do gene CFTR; ② identificar a frequência de algumas mutações freqüentes no gene CFTR (R347P, R347H, R334W, Q359K, G542X, G551D, R553X, S549N, R1162X, W1282X e N1303K) na amostra e estimar a frequência destas mutações na população estudada; ③ determinar o genótipo dos pacientes com FC participantes do estudo; ④ estabelecer um protocolo eficiente e rápido para identificar as alterações de politimidinas em pacientes não homocigotos para a mutação $\Delta F508$; ⑤ estabelecer a frequência dos alelos 5T, 7T e 9T em pacientes com FC do sul do Brasil; ⑥ estabelecer a correlação do polimorfismo politimidinas com manifestações clínicas da doença, como por exemplo, azoospermia.

Para a identificação das mutações no gene CFTR foram avaliados 100 alelos ou 50 pacientes portadores de FC. No entanto, para a avaliação do polimorfismo de politimidinas foram avaliados 54 pacientes não relacionados. Estes pacientes foram previamente diagnosticados e se encontram em tratamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Após extração de DNA destes pacientes, o material foi amplificado por PCR utilizando-se *primers* específicos para as regiões de interesse. A identificação de alterações nas seqüências de nucleotídios foi possível através da técnica de SSCP. Esta

técnica permitiu a detecção de 7 pacientes com alteração no exon 7, 3 pacientes com alterações no exon 11, 2 pacientes com alterações no exon 19 e de 3 pacientes com alterações no exon 20. Nenhum paciente apresentou alteração molecular nos exons 3, 4, 5, 12 e 22.

As frequências das mutações R334W, R1162X e W1282X na amostra estudada foram estabelecidas em 1,0% para cada uma delas. Não foram encontrados pacientes portadores das mutações R347P, R334H, Q359N e S549N na amostra estudada. Com a utilização deste protocolo associado ao do estudo anterior (Streit *et al.*, 1999) foi possível a triagem de mutações em 44,4% do gene da FC.

O alelo 5T foi encontrado em 2 dos 108 alelos analisados. Já o polimorfismo 7T, o mais comum, foi detectado em 65 alelos, enquanto o polimorfismo 9T estava presente em 41 alelos. O genótipo mais comum estabelecido no presente estudo foi o 7T/9T, encontrado em 39 pacientes (72,2%), seguido do genótipo 7T/7T, encontrado em 12 pacientes (22,2%), e do 5T/7T, encontrado em 2 pacientes (3,7%) e, finalmente, do genótipo 9T/9T, em 1 paciente (1,85%). Os resultados obtidos sugerem que o fenótipo dos pacientes com FC estudados não resulta apenas do genótipo dos mesmos, pois existem pacientes com o mesmo genótipo e expressões fenotípicas diferentes.

Fatores epigenéticos assim como ambientais devem influenciar a expressão das alterações moleculares. Entretanto, a identificação do defeito molecular básico é de fundamental importância para a confirmação precoce e precisa do diagnóstico em pacientes suspeitas e para o estudo familiar permitindo que as medidas de tratamento e prevenção sejam implementadas do modo mais eficiente.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF), or mucoviscidosis, is one of the most common genetic disease in Caucasians, with an incidence of one case in every 2000 life-births, giving a frequency of 5% in the general population. CF is an autosomal recessive disorder characterized mainly by chronic pulmonary illness, pancreatic exocrine insufficiency and high levels of sweat electrolytes. Clinical manifestations and severity of this disease varies greatly among patients including congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD). Up to date, more than 1000 mutations are associated with CF, and R117H mutation was related to a variable length of a polythymidine tract in intron 8 of CFTR. This polymorphism could be related to CBAVD in CF patients.

The present work aimed to identify molecular alterations in the nucleotide sequence of exons 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 19, 20 and 22 of the CFTR gene; to establish the frequency of some common mutations in the CFTR gene (R347P, R347H, R334W, Q359K, G542X, G551D, R553X, S549N, R1162X, W1282X and N1303K) in our sample; to establish the genotype of CF patients included in this study; to establish a rapid and accurate protocol to identify the polythymidines tract; to establish the frequency of the 5T, 7T and 9T alleles in patients from South region of Brazil; to establish a relationship between polythymidines and clinical manifestation, such as male infertility.

Hundred alleles or fifty unrelated patients were analyzed to identify specific mutations in the CFTR gene. Fifty-four CF patients were analyzed to identify identify the polythymidines tract in intron 8 of the CFTR gene. These patients were previously diagnosed and are currently under treatment in the Pneumology Service of the HCPA.

Following DNA extraction, regions of interest were amplified by PCR using specific primers. Using the SSCP protocol, seven patients were found to have a sequence alteration in exon 7, 3 patients in exon 11, 2 patients in exon 19 and 3 patients in exon 20. No alterations were detected in exons 3, 4, 5, 12, and 22. Frequencies of mutations R334W, R1162X, and W1282X in the studied sample were established to be 1.0% for each mutations. No alleles carried mutations R347P, R334H, Q359N, and S549N in this sample. This

protocol associated to a previous study (Streit et al., 1999) screened 44.4% of the coding region of CFTR.

The 5T allele was present in 2 alleles out of 108 alleles tested; while allele 7T, the most common, was detected in 65 alleles. The 9T was present in 41 alleles. The most common genotype established in the present study was 7T/9T identified in 39 patients (72.2%), followed by genotype 7T/7T in 12 patients (22.2%), and 5T/7T, detected in 2 patients (3.7%) and, finally, the genotype 9T/9T, founded in one patient only (1.85%). Our results suggested that the phenotype of CF patients is influenced by many factors due to the fact that patient can carry same genotype and show different clinical presentation of the disease. CF is a genetically heterogeneous and complex disorder, involving mutations, variants of the CFTR gene and epigenetic factors.

This study is important to help families at risk, in addition to provide diagnosis confirmation and an earlier and accurate diagnosis for CF patients.

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Parte 1.	
Figura 1.1- O gene e a proteína CFTR	5
Figura 1.2- Estrutura prevista da proteína CFTR	7
Figura 1.3- Representação das cinco classes de mutações responsáveis por FC	20
Parte 8.	
Figura 8.1- Protocolo laboratorial empregado no presente estudo	98
Figura 8.2- Protocolo laboratorial empregado para a investigação de politimidinas no presente estudo	99
Figura 8.3- Seqüência de oligonucleotídeos de regiões do CFTR	104
Figura 8.4 – Amplificação do exon 7 do gene CFTR	118
Figura 8.5- Análise do exon 7 pela técnica de SSCP do gene CFTR	119
Figura 8.6- Análise do exon 4 pela técnica de seqüenciamento direto de DNA (<i>primer</i> utilizado no sentido 3' a 5')	120
Figura 8.7- Análise do exon 4 pela técnica de seqüenciamento direto de DNA (<i>primer</i> utilizado no sentido 5' a 3')	120

LISTA DE TABELAS

	Pg.
Parte 1.	
Tabela 1.1- Localização das mutações mais freqüentes no gene CFTR	10
Tabela 1.2- Freqüência relativa de mutações no gene CFTR em diferentes populações	12
Tabela 1.3- Resultados de estudos realizados no Brasil	26
Parte 5.	
Tabela 5.1- Número de pacientes identificados com alterações pela técnica de SSCP em seus respectivos exons	65
Tabela 5.2- Mutações específicas pesquisadas	66
Tabela 5.4- Genótipo do gene CFTR para os 54 pacientes	72
Parte 8.	
Tabela 8.1- Idade dos pacientes no momento do diagnóstico	94
Tabela 8.2- Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo	95
Tabela 8.3- Protocolo básico para as reações de amplificação por PCR	107
Tabela 8.4- Condições de amplificação	108
Tabela 8.5- Fragmentos do gene CFTR analisados neste estudo	112
Tabela 8.6- Detecção das mutações R334W, R347H, R347P, Q359K, S549N e W1282X no gene CFTR	114

ABREVIATURAS

1X	uma vez
5X	cinco vezes
10X	dez vezes
A	adenina
ACVD	agenesia congênita de vasos deferentes
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina trifosfato
BRL	<i>Bethesda Research Laboratories</i>
BSA	albumina de soro bovino
C	citossina
CFTR	Condutância Transmembrânica da Fibrose Cística
°C	graus Celsius
dCTP	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
Co.	Companhia
CO ₂	dióxido de carbono
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
del	deleção
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FC	fibrose cística
G	guanina
g	grama
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
HCl	ácido clorídrico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ins	inserção
IP	insuficiência pancreática
IRT	tripsinogênio imunorreativo
Kb	quilobases
KDa	quilodaltons
L	litro
M	molar
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
mEq/L	miliequivalente por litro
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
min	minuto
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MSD	domínio de expansão de membrana (<i>membrane spanning domain</i>)
NBD	domínio de ligação de ATP (<i>nucleotide binding domain</i>)
ng	nanograma
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PM	peso molecular
pmol/µL	picomoles por microlitro
PrS	prova do suor
p/v	peso/volume

q.s.p.	quantidade suficiente para
RD	domínio regulatório (<i>regulatory domain</i>)
RFLP	polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	ácido ribonucleíco
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SGM	Serviço de Genética Médica
SSCP	conformação de polimorfismos de cadeia simples
SP	suficiência pancreática
T	timina
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
TBE	tris/ácido bórico/EDTA
TE	tris-EDTA
TEMED	tetrametiletilenodiamina
TR	repetições seqüenciais nas mucinas (<i>Mucin tandem repeats</i>)
Tris	tris-(hidroximetil)-aminoetano
U/ μ L	unidades por microlitro
U/mL	unidades por mililitro
v/v	volume/volume
V	volts
W	watts

Parte 1

INTRODUÇÃO

	Pg.
1.1- FIBROSE CÍSTICA	2
1.2- CONTEXTO HISTÓRICO	2
1.3- ASPECTOS MOLECULARES	4
1.3.1- MAPEAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA FC	4
1.3.2- ESTRUTURA MOLECULAR DO GENE	5
1.3.3- RNA MENSAGEIRO E A PROTEÍNA CFTR	6
1.3.4- A MUTAÇÃO $\Delta F508$	8
1.3.5- OUTRAS MUTAÇÕES DESCRITAS	9
1.3.6- AS MUTAÇÕES E A HETEROGENEIDADE POPULACIONAL	11
1.3.7- GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA FC	13
1.4- MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	13
1.5- CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO	17
1.6- ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS	23
1.7- FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL	24
1.8- DIAGNÓSTICO DE FC	25

1.1- FIBROSE CÍSTICA

Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é uma das doenças hereditárias mais comuns em caucasóides, com freqüência estimada em um caso em cada 2000 nascimentos (Rommens *et al.*, 1989). A freqüência calculada de indivíduos portadores de mutações no gene da FC é de aproximadamente 5% em indivíduos normais caucasóides (Rommens *et al.*, 1989). Atualmente, existem mais de 50000 indivíduos afetados no mundo (Colledge, 1994).

A FC é um importante problema médico, pois esta é uma patologia complexa, crônica, grave, envolvendo diversos sistemas orgânicos. É caracterizada, principalmente, por infecções e obstrução crônica do aparelho respiratório, insuficiência pancreática exócrina e suas conseqüências nutricionais e por elevados níveis de eletrólitos no suor. FC está associada a uma morbidade e mortalidade em jovens adultos (Welsh *et al.*, 2001).

1.2- CONTEXTO HISTÓRICO

A primeira menção quanto às características relevantes nos pacientes com FC está na própria denominação conferida pelo patologista Landsteiner em 1905 ao descrevê-la como “fibrose cística do pâncreas”, uma enfermidade do pâncreas exócrino, não envolvendo as ilhotas de Langherans. Landsteiner já constataria em alguns pacientes recém-nascidos, a concomitância de íleo meconial. Em 1936, Fanconi e colaboradores descreveram uma síndrome celíaca com alterações pancreáticas, percebidas por eles como diferentes da doença celíaca típica (Campos *et al.*, 1996).

Em 1938, Dorothy Andersen, em um estudo minucioso, associou definitivamente as lesões pancreáticas às pulmonares, indicando também o íleo meconial como manifestação mais precoce da doença. Assim, Andersen consolidou a FC como uma entidade clínica autônoma, multissistêmica, com uma incidência familiar significativa. Farber, em 1944, observou o caráter anormal espesso e viscoso das secreções mucosas das várias glândulas exócrinas. Este cientista conferiu a designação de mucoviscidose à doença, enfatizando o bloqueio dos ductos pancreáticos e da árvore brônquica por esta secreção anômala (Campos *et al.*, 1996). Em 1946, sugeriu-se, pela primeira vez,

o padrão de herança autossômico recessivo. Um passo essencial para o diagnóstico foi dado em 1953, quando Di Sant'Agnese e colaboradores demonstraram o teor anormalmente elevado de íon cloreto no suor (Campos *et al.*, 1996). Em seguida, Schwachman e colaboradores, com base nas observações feitas por Di Sant'Agnese em 1955-56, pesquisaram as taxas de eletrólitos no suor, o que hoje é um referencial no diagnóstico de FC, conhecido universalmente como prova do suor (PrS).

Em 1970, Campos e Szterling registraram grandes avanços sobre a estrutura das membranas celulares, com enfoque na dinâmica do transporte de íons por “canais bioquímicos” e na presença de permeases ou proteínas na estrutura bilipídica da membrana apical. Estes pesquisadores buscaram subsídios científicos na seqüência gene-enzima-rota bioquímica, retomando os antigos ensinamentos de Garrod que, em 1908, propusera o conceito dos “erros inatos do metabolismo”. Na revisão realizada por Campos e Szterling foi chamada a atenção para a hipótese de Johansen e colaboradores sobre as bombas celulares de íons cloreto e sódio na FC (Campos *et al.*, 1996).

Em 1983, Paul Quinton descreveu que a permeabilidade do escoamento do íon cloreto para os ductos estava defeituosa em pacientes com FC (Quinton, 1983). Canais apicais para o íon cloreto estavam presentes, mas sua regulação pelo AMP-cíclico mostrava-se alterada. Sabe-se hoje que, para tal alteração, concorre um comprometimento estrutural de uma proteína reguladora da condutância transmembrânica da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - CFTR). Quinton e Bijman em 1983 registraram altos potenciais bioelétricos a nível da membrana devidos ao decréscimo da absorção de íon cloreto nas glândulas sudoríparas dos pacientes com FC (Quinton e Bijman, 1983). Em 1984, Anderson comentou as alterações do metabolismo de prostaglandina E₂ (PGE₂) e a associação destas alterações com FC (Campos *et al.*, 1996).

Em 1985, surge a primeira indicação da presença do gene da FC no cromossomo 7 (Wainwright *et al.*, 1985). Em 1989, foi descoberto o gene que, quando defeituoso, causava FC e o defeito na proteína produzida pelo gene CFTR. Com base em pesquisas realizadas de mapeamento genético e físico foi

possível a realização de estudos de clonagem molecular com pequenos segmentos de DNA do cromossomo 7.

1.3- ASPECTOS MOLECULARES

O defeito bioquímico primário na FC permaneceu desconhecido até alguns anos atrás, quando o isolamento do gene relacionado a esta doença proporcionou as informações necessárias para a melhor compreensão da estrutura da proteína, da sua função e do efeito de mutações neste gene. A maior dificuldade no mapeamento e identificação do *locus* da FC foi a falta de translocações e deleções cromossômicas conhecidas e associadas com a doença. Várias estratégias e técnicas moleculares de clonagem foram empregadas na tentativa de isolar o gene e este objetivo foi alcançado em 1989 através de protocolos de "triagem do cromossomo" (*chromosome walking and jumping*) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

1.3.1- MAPEAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA FC

Em 1985, encontrou-se ligação genética entre a enzima paroxonase e a fibrose cística (Eiberg *et al.*, 1985). Entretanto, a localização cromossômica do gene da paroxonase não era bem conhecida. Nesse mesmo ano encontrou-se uma forte ligação genética entre a FC e um marcador polimórfico de localização desconhecida (DOCRI-917), posteriormente localizado no cromossomo 7 (Knowlton *et al.*, 1985).

Análise de ligação utilizando um grande número de marcadores polimórficos de DNA reduziram a possível região para o *locus* do gene da FC a cerca de 700 kilobases (kb). Foi localizado, então, o gene da FC no braço longo do cromossomo 7, na região q31-32 (figura 1.1) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Em 1989, o gene responsável pela FC foi identificado. Uma região do DNA de 250kb foi isolada através de uma série de experimentos de clonagem molecular que se basearam no isolamento de pequenos segmentos da região de interesse.

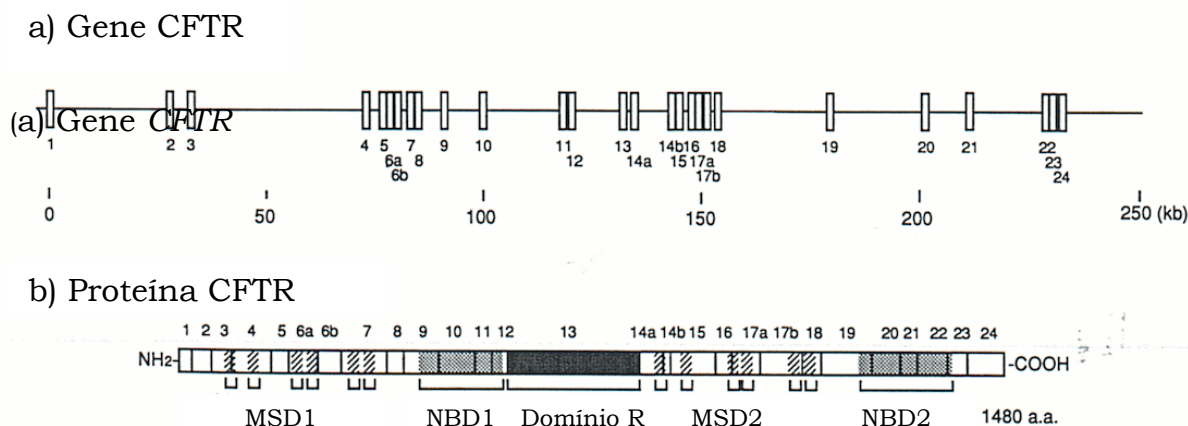


Figura 1.1: **O gene e a proteína CFTR.** (a) Organização exon-intron do CFTR. Os exons são indicados por retângulos. (b) Estrutura do polipeptídeo com seus múltiplos domínios. (Reproduzido de Welsh *et al.*; 2001).

Estes fragmentos foram purificados e testados para a presença de seqüências codificadoras (Rommens *et al.*, 1989; Welsh *et al.*, 2001).

1.3.2- ESTRUTURA MOLECULAR DO GENE

O gene da FC engloba 250kb de DNA genômico (Welsh *et al.*, 2001). A região codificante do gene está dividida em 27 exons numerados de 1 a 24, mas incluindo os exons 6a e 6b, 14a e 14b e 17a e 17b (figura 1.1). A maioria desses exons compreendem entre 50 a 250 pb, com exceção do exon 13 (Harris, 1992). O tamanho médio dos exons é de 200pb. O exon 6a é o menor e mede 38pb, enquanto o exon 13 é o maior, com um tamanho de 723pb. A seqüência de nucleotídeos dos exons e de suas seqüências flangeadoras é conhecida e é altamente conservada em espécies distintas, incluindo as que apresentam grande divergência evolutiva (Tuker *et al.*, 1992). Estes exons codificam a síntese de uma proteína denominada regulador de condutância transmembrânica da fibrose cística ou *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR).

O tamanho dos introns também é muito variável, ficando na faixa de 1,1kb (intron 6a) e 40kb (intron 3).

1.3.3- RNA MENSAGEIRO E A PROTEÍNA CFTR

O mRNA produzido pelo gene CFTR apresenta aproximadamente 6,5kb e pode ser identificado em uma grande variedade de tecidos afetados, incluindo o pulmão, o pâncreas, as glândulas sudoríparas, os pólipos nasais, as glândulas salivares e o cólon (Welsh *et al.*, 2001).

Considerando a seqüência do DNA complementar (cDNA) do CFTR, a estrutura desta proteína filamentar é composta por 1480 aminoácidos, com uma massa molecular de aproximadamente 168 kDa (Harris, 1995; Welsh *et al.*, 2001) (figura 1.2). Esta proteína é definida como uma “peça bioquímica” fundamental, a qual é transportada do local de síntese (núcleo) para a membrana celular apical e direcionada através do retículo endoplasmático. Esta proteína ancora-se na estrutura bilipídica da membrana em áreas hidrofílicas e hidrofóbicas afins (Campos *et al.*, 1996). Um verdadeiro canal é formado por um longo filamento da CFTR, numa adaptação conformacional, por sobreposição em alças (Welsh *et al.*, 2001).

Nessa disposição transmembrânica, esse canal direciona e regula os fluxos bidirecionais de água e íons cloreto no sentido do ambiente intracelular para o extracelular e vice-versa. Entre os vários canais iônicos normalmente existentes na membrana, este é o chamado canal do cloro ligado à CFTR, cuja regulação, também bidirecional, de abertura e fechamento, é ativada por fosforilação e intermediada pelo cAMP na presença de ATP. O CFTR é um componente da família das glicoproteínas de transporte que necessitam de ligação de ATP (Hyde *et al.*, 1990).

A estrutura da proteína pode ser dividida em cinco regiões: duas regiões que se estendem pela membrana, duas regiões de ligação de nucleotídios e uma região regulatória (figura 1.2) (Harris, 1995; Welsh *et al.*, 1995; Patrizio e Zielenski, 1996).

As duas regiões que se estendem pela membrana são compostas por 6 segmentos intra-membrânicos (hidrofóbicos) e são denominados domínios de expansão de membrana (MSD). Os dois domínios de ligação de nucleotídios (NBD) interagem com o ATP (figura 1.1).

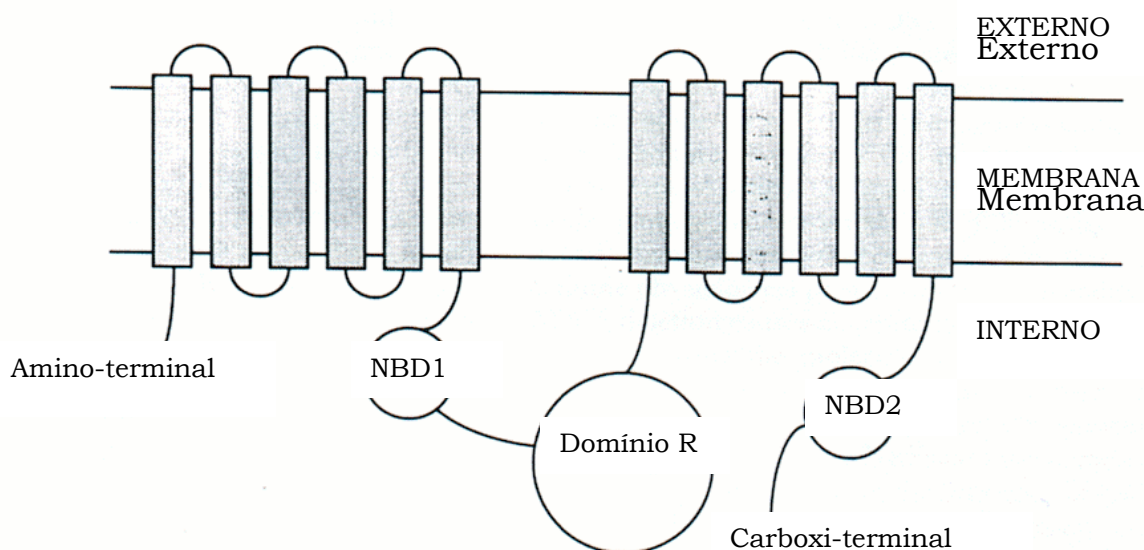


Figura 1.2: **Estrutura prevista da proteína CFTR.** (Reproduzido de *Harris e Argent, 1993*).

Finalmente, a região regulatória (RD), localizada na porção intermediária da molécula do CFTR, é codificada por um único exon (exon 13) e contém múltiplos sítios de fosforilação para proteína kinases A e C (Harris e Argent, 1993; Welsh *et al.*, 1995; Patrizio e Zielenski, 1996).

Tanto na secreção da glândula sudorípara quanto na secreção epitelial dos brônquios existem falhas bidirecionais no transporte de íon cloreto pelo canal específico dirigido pela proteína CFTR. Quanto à secreção de suor na FC, a disfunção, isto é, a falha da captação eficiente pelo canal de cloreto, que é ionicamente acompanhada por proporcional interferência no transporte de sódio, situa-se no bordo apical das células epiteliais que recobrem os ductos finos das glândulas sudoríparas (Quinton, 1983). A secreção fluida e serosa, que é hipertônica na parte mais profunda da glândula devido a falta da captação ativa de cloreto, compromete a transferência facilitada do sódio ao passar pela área tubular. Entretanto, ao invés do suor tornar-se hipotônico, quase desionizado, levemente salino, acaba atingindo a superfície da pele com

taxas iônicas elevadas. Este fato explica o suor salgado dos pacientes e sua fragilidade à desidratação pelo calor e quando expostos ao sol.

Quanto à secreção brônquica, do tipo mucoso, Knowles e colaboradores (1983) demonstraram que na FC existe uma diminuição no transporte direcional do íon cloreto da membrana apical das células epiteliais para a superfície do lúmen. Entretanto, a captação de sódio está aumentada no sentido oposto. Haveria uma compensação direcional em sentido oposto, isto é, na condução de sódio e água para o interior da célula, visando a eletroneutralidade. A redução da água retirada do fluido peri-ciliar ou perimicrovilositário de ambas camadas de superfície do glicocálix, conduziria ao espessamento do muco característico da FC (Campos, 1993b).

1.3.4- A MUTAÇÃO $\Delta F508$

A mutação mais freqüente encontrada associada à FC é uma deleção do codon 508 (CTT - 3 pares de bases) no 10^o exon causando a perda de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da proteína (Kerem *et al.*, 1989); sendo denominada $\Delta F508$. Esta mutação é responsável por aproximadamente 68% dos genes mutantes causadores de FC em diferentes populações pelo mundo (Welsh *et al.*, 2001). Os cromossomos portadores da deleção 508, possivelmente derivaram de um único evento mutacional (Russo *et al.*, 1995).

A mutação $\Delta F508$ interrompe o processo de biossíntese de CFTR sendo que a proteína fica retida no retículo endoplasmático, sendo degradada. Como resultado, na membrana apical do epitélio afetado, falta a proteína CFTR e falta a estimulação de cAMP que permite a permeabilidade aos íons cloreto (Zeihner *et al.*, 1995).

Portanto, a mutação $\Delta F508$ está associada às manifestações clínicas graves de FC; entretanto, existe ainda uma grande variabilidade do grau de comprometimento da doença entre as pessoas que apresentam esta mutação e quando em combinação com outra mutação no CFTR (homozigotos ou heterozigotos compostos). Insuficiência pancreática (IP) está associada à $\Delta F508$, pois esta manifestação clínica foi encontrada em 99% dos pacientes homozigotos para esta mutação e em 72% dos heterozigotos para a deleção, enquanto que

apenas 36% dos pacientes com outras mutações apresentaram IP (Kerem *et al.*, 1990a).

A distribuição da mutação $\Delta F508$ na Europa apresenta frequência elevada no nordeste europeu e mais baixa no sudeste da Europa. Isto ocorre, provavelmente, devido à dispersão desta mutação pelos primeiros fazendeiros que migraram do médio oeste durante o período Neolítico. A difusão do gene pode ter sido favorecida por uma vantagem seletiva conferida a ele. Uma alta frequência desta mutação foi encontrada em províncias Bascas, uma das populações mais antigas da Europa, onde a incidência de FC era de aproximadamente 1:4500 indivíduos. Triagens de mutações realizadas em milhares de famílias com casos de FC demonstraram que cerca de 75% dos cromossomos mutados no *locus* da FC na população do Norte da Europa (McIntosh, Lorenzao e Brock, 1989) e da América do Norte (Kerem *et al.*, 1989b) apresentam a deleção $\Delta F508$. Em algumas populações essa mutação não é tão freqüente. No sul da Europa, somente 50% dos alelos mutados apresentam a mutação $\Delta F508$ e, quanto mais nos aproximamos do sul da Europa, mais diminui a frequência dessa mutação (Estivill *et al.*, 1989a; Gasparini *et al.*, 1990).

1.3.5- OUTRAS MUTAÇÕES DESCRITAS

Atualmente já foram descritas 1006 mutações pelos membros do Comitê Internacional de Análise Genética da Fibrose Cística (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>), cujas informações são mantidas em um banco de dados criado em 1989. Esse banco de dados é atualizado periodicamente pelos integrantes do laboratório do Dr. Lap-Chee Tsui (Canadá).

Na grande maioria, as mutações descritas são consideradas patológicas, sendo que apenas um pequeno número delas determinam um comportamento clínico evidentemente grave e predominam em certos grupos populacionais (Estivill *et al.*, 1989; Bowling *et al.*, 1990), enquanto que em torno de 10 a 20% das mutações do gene da FC são provavelmente variações seqüenciais benignas (Welsh *et al.*, 1995). A prevalência e a distribuição das mutações freqüentes na proteína podem ser observadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1: **Localização das mutações mais frequentes no gene CFTR** (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Domínios do CFTR	Exon	Mutação	População com maior prevalência
MSD1	3	394delTT	Nórdicos, Irlandeses
		G85E	
	4	621+1G→T	
		R117H	
		Y122X	Franceses, <i>Reunion Island</i>
		I148T	Franco-canadenses
	7	R347P	
		1078delT	
		R334W	
		Q359K	Judeus
T360K		Judeus	
NBD1	9	A455E	
		G458V	
	10	ΔF508	
		ΔI507	
	11	G551D	Ingleses
		G542X	Espanhóis, Italianos
		R553X	Alemães
		S549I	
		S549N	
		S549R (A→C)	
S549R (T→G)			
R560T			
RD	13	2183A→G	Italianos
		2184delA	
MSD2	17b	M1101K	<i>Hutterite</i>
NBD2	19	R1162X	Italianos
		3659delC	
	20	W1282X	Judeus
		3905insT	Suíços, <i>Amish</i> , <i>Acadian</i>
	21	N1303K	Italianos
		W1316X	

As mutações no gene da FC não são aleatórias, estando mais comumente localizadas na primeira metade da proteína CFTR, sobretudo no NBD1 (primeiro domínio de ligação de nucleotídeo), particularmente nos exons 10 e 11. A região MSD1 (primeiro domínio de expansão de membrana) revela um aglomerado de mutações nos exons 4 e 7. Poucas e raras mutações são encontradas no domínio R (região regulatória) e na região MSD2 (segundo domínio de expansão de membrana). A região NBD2 (segundo domínio de ligação de nucleotídeo), assim como o primeiro, é sítio de diversas mutações, principalmente nos exons 19 e 20. Cerca de 44% das mutações alteram o sentido de transcrição, devido à substituição de aminoácidos (*missense*), 22% são do tipo que desvia ou altera o quadro de leitura (*frameshift*), 14% das mutações determinam a terminação da cadeia (*nonsense*), 16% impedem o processamento correto do RNA mensageiro (*splicing*), 4% são deleções (Welsh *et al.*, 2001). Extensas análises haplotípicas, utilizando marcadores extra e intragênicos, demonstram que a maioria das mutações estão associadas com haplótipos únicos, indicando que essas mutações são, possivelmente, derivadas de um único evento mutacional (Morral *et al.*, 1993; Morral *et al.*, 1996).

1.3.6- AS MUTAÇÕES E A HETEROGENEIDADE POPULACIONAL

Em nível molecular, o defeito em FC é causado por mutações que afetam a função da CFTR através de diferentes mecanismos, como a síntese desta proteína e o processamento intracelular incompleto e a maturação da mesma, além do defeito na regulação e transporte iônico. Algumas mutações são encontradas com muita frequência em populações específicas, ao passo que, em outras populações, estas mutações são raramente encontradas; isto é, sua distribuição na população depende da origem étnica e da localização geográfica (Patrizio e Zielenski, 1996) (Tabela 1.2). Estas considerações apresentam suma importância quando estratégias de triagem para FC são delineadas para diferentes grupos étnicos.

A população de judeus Ashkenazi apresenta uma baixa frequência da mutação $\Delta F508$ quando comparada com outras populações, entretanto apresenta uma frequência elevada das mutações G542X e W1282X.

Tabela 1.2: **Frequência relativa de mutações no gene CFTR em diferentes populações.**

Mutação	População	Frequência Relativa	Referência
ΔF508	Dinamarqueses	88%	Welsh <i>et al.</i> , 1995
	Franco-canadenses	71%	Rozen <i>et al.</i> , 1990
	Judeus-Ashkenazi	30%	Welsh <i>et al.</i> , 1995
	Turcos	26%	Welsh <i>et al.</i> , 1995
	Mundial	66%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
G542X	Espanhóis		
	Belgas	7,3%	Cuppens <i>et al.</i> , 1990
	Judeus-Ashkenazi	13%	Lerer <i>et al.</i> , 1992
	Mundial	2,4%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
G551D	Inglêses		
	Celtas	3,1%	Hamosh <i>et al.</i> , 1992
	Mundial	1,6%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
N1303K	Italianos		
	Europeus	1,5%	Osborne <i>et al.</i> , 1992
	Mundial	1,3%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
W1282X	Judeus-Ashkenazi	50%	Hamosh <i>et al.</i> , 1991
	Mundial	1,2%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
R553X	Alemães		
	Mundial	0,7%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
621+1G→T	Franco-canadenses		
	Mundial	0,7%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
1717-1G→A	Franco-canadenses		
	Mundial	0,6%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
R117H	Mundial	0,3%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
R1162X	Italianos		
	Mundial	0,3%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
R347P	Mundial	0,2%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
3849+10kb C→T	Espanhóis	2%	Dreyfus <i>et al.</i> , 1996
	Mundial	0,2%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
ΔI507	Mundial	0,2%	http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
2789+5G→A	Espanhóis		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
711+1G→T	Franco-canadenses		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
2183A→G	Italianos		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
1898+5G→T	Chineses		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
3120+1G→A	Afro-americanos		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *
I148T	Franco-canadenses		http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ *

* Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994.

Pela triagem dessas três mutações pode-se determinar em torno de 90% das mutações associadas à FC nesse grupo.

1.3.7- GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA FC

A FC tem uma frequência gênica excepcionalmente alta para uma anomalia que, até alguns anos atrás, era letal, ou seja, os indivíduos afetados não atingiam a idade reprodutiva. A FC, por ser uma doença genética transmitida de modo autossômico recessivo, apresenta igual proporção de indivíduos afetados e portadores de ambos os sexos. Além disso, não existe evidência de segregação distorcida para os alelos da FC (Kitzis et al., 1995). Baseando-se na incidência de 1 caso para cada 2500 nascimentos vivos, a frequência total dos alelos mutados seria igual à 0,02236, segundo o teorema de Hardy-Weinberg, o que é excepcionalmente alto para uma anomalia letal. Os portadores transmissores do gene mutado são os heterozigotos, portadores assintomáticos (Raskin e Faucs, 2001).

Diversas são as hipóteses a propósito da elevada frequência das mutações FC na população caucasóide: a) heterogeneidade genética; b) taxa de mutação elevada; c) deriva ou fluxo gênico; d) vantagem seletiva para os heterozigotos. Dentre essas, a mais aceita é a possibilidade de uma vantagem para os portadores, em razão de certos fatores favoráveis, tanto na reprodução quanto na sobrevivência contra os mecanismos seletivos, atuais ou passados (Pier *et al.*, 1998; Guggino, 1999).

Todavia, alguns pesquisadores acreditam que não há necessidade de postular seleção para heterozigotos para explicar as altas frequências gênicas, dada a recente expansão de tantas populações humanas (Thompson e Neel, 1997). Com base nas análises haplotípicas, fatores extragenéticos têm sido também propostos como explicação da vantagem seletiva (Cuppens *et al.*, 1993).

1.4-MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O defeito básico de FC está diretamente relacionado com uma regulação anormal da permeabilidade dos íons cloreto nas células epiteliais de vários órgãos, incluindo o pulmão, o pâncreas, o fígado, as glândulas sudoríparas e o intestino, com uma variedade muito grande dos níveis de comprometimento nos diferentes pacientes (Chou *et al.*, 1991). As manifestações clínicas

freqüentes incluem cirrose do fígado, diabetes *mellitus* e infertilidade (especialmente em homens) (Welsh *et al.*, 2001).

A manifestação multissistêmica do defeito básico confere à enfermidade extensa variabilidade clínica de acordo com os órgãos ou tecidos glandulares exócrinos envolvidos. No entanto, é possível distinguir as áreas mais intensamente comprometidas e vulneráveis aos sintomas da doença:

- *a área respiratória:* o envolvimento pulmonar é o fator de maior morbidade e mortalidade (Kerem *et al.*, 1990a; Kerem *et al.*, 1990b). É difícil a comprovação de uma relação direta entre a gravidade do quadro pulmonar e o genótipo, provavelmente pelo fato do pulmão sofrer mais a influência do meio ambiente, do que do componente genético variabilidade. Isto ocorre devido ao extenso contato que este órgão possui com o meio ambiente ao qual está exposto constantemente. Recentemente, foi identificado um outro *locus* no cromossomo 19q13 com o potencial de modulação da gravidade dos sintomas da FC (Zielenski *et al.*, 1999). Estudos mais aprofundados podem ser de grande valor para estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo pulmonar mais precisa.

- *a área digestiva:* se caracteriza pelo envolvimento pancreático exócrino, pela má absorção pré-entérica, pela esteatorréia e pela creatorréia, além do indicador clínico precoce, o íleo meconial (Campos, 1993a). Quanto ao quadro pancreático podemos destacar duas formas clínicas: a insuficiência pancreática (IP) e a suficiência pancreática (SP). A IP acomete cerca de 85% dos pacientes e a SP, que está presente em 15% dos pacientes, não requer a reposição de enzimas junto com os alimentos. Embora o nível de atividade pancreática residual varie segundo os pacientes, a grande maioria dos pacientes homozigotos para a mutação $\Delta F508$ evoluem para IP, enquanto os pacientes com SP são heterozigotos compostos desta mutação associada a outra mutação (não- $\Delta F508$) no outro cromossomo ou apresentam duas mutações diferentes da $\Delta F508$ (Kerem *et al.*, 1989b; Gasparini *et al.*, 1990). Portanto, a mutação $\Delta F508$ seria uma mutação grave com efeito parcialmente compensado quando acompanhada de uma mutação mais leve, evoluindo,

neste caso, dentro do grupo de pacientes com SP (Kerem *et al.*, 1990a). Todas as mutações que alteram o código de terminação, o processamento do mRNA, que desviam ou alteram o quadro de leitura e as deleções seriam do tipo grave. As mutações que causam a substituição de aminoácidos, poderiam ser graves ou leves dependendo da importância funcional do sítio da mutação. Além da $\Delta F508$ pelo menos mais 10 mutações estão associadas com a forma IP (mutações G542X, 390insT, 621+1G→T, $\Delta I507$, A559T, N1303K, G551D, G1244E, S1255P, G1349D) e pelo menos 5 com a forma SP (mutações R117H, R334W, R347P, A455E e P574H) (Kristidis *et al.*, 1992). As mutações que não acarretam IP teriam um papel dominante sobre as que causam essa insuficiência (Kerem *et al.*, 1989b). Mesmo sabendo que a FC é uma doença autossômica recessiva, verifica-se que quando o indivíduo possui um alelo para IP e outro para SP, o fenótipo é compatível com SP. Dessa forma, uma mutação “dominante” estaria conferindo a atividade parcial do canal de cloro, permitindo um fenótipo mais benigno (Welsh e Smith, 1993). O comprometimento da função pancreática é freqüentemente encontrado em pacientes com idade mais avançada, sendo difícil dizer que um paciente com SP assim permaneça para o resto da vida.

- *a área nutricional:* sofre a sobrecarga de um gasto calórico hipercatabólico;

- *a secreção anormal de eletrólitos no suor:* característica marcante da doença, sendo responsável pela depleção eletrolítica, pela desidratação aguda pelo calor, etc;

- *manifestações gênito-urinárias:* variam conforme o sexo do paciente. Índices elevados de esterilidade podem ser encontrados em pacientes do sexo masculino podendo atingir 95 a 97% dos casos. As transformações mais importantes ocorrem no sistema dos ductos de Wolff, em particular no epidídimo, nos canais deferentes e nas vesículas seminais. O volume de sêmen ejaculado é reduzido. Após a puberdade, os testículos podem se apresentar de tamanho normal ou reduzidos em seu volume. Várias anormalidades descritas

podem ser detectadas logo após o nascimento. Apesar da esterilidade e azospermia, a função hormonal testicular e a atividade sexual masculina não são necessariamente comprometidas. Já a infertilidade feminina é discutível e quase sempre atribuída ao muco cervical espesso, que pode impedir a ascensão dos espermatozóides para a fecundação. Uma manifestação clínica leve e atípica da FC foi verificada em homens com agenesia congênita de vasos deferentes (ACVD). Estes indivíduos normalmente não apresentam comprometimento pulmonar ou pancreático, sendo a principal manifestação da doença a esterilidade. Em um estudo realizado com homens clinicamente normais para FC, portadores de ACVD e com níveis elevados ou limítrofes de cloro no suor, foi verificado que aproximadamente 40% eram heterozigotos para a mutação $\Delta F508$. Sendo assim, nesse grupo a frequência desta mutação é cerca de 10 vezes maior que a frequência de portadores de FC na população caucasóide (1:25) (Dumur *et al.*, 1990). Sabe-se ainda que esses indivíduos são portadores de outra mutação no outro alelo desse gene. A mutação R117H apresenta alta frequência entre os homens com ACVD, atingindo cerca de 22% desses pacientes. Dos heterozigotos para R117H, 75% possuíam a mutação $\Delta F508$ no outro alelo (Gervais *et al.*, 1993). Entretanto, em estudo prévio, o primeiro paciente com ACVD homozigoto para R117H apresentava teste de suor normal (Bienvenu *et al.*, 1993). Diversos estudos mostraram que um polimorfismo de um dinucleotídeo localizado no final do intron 8 pode interferir na manifestação clínica de esterilidade em FC, quando associado à mutação no outro alelo (Dumur *et al.*, 1996). Aparentemente, é a primeira vez que se demonstra a ocorrência de um polimorfismo afetando a remoção de um exon em indivíduos normais, e esse exon, por sua vez, está interferindo na manifestação clínica de uma mutação deletéria (Raskin e Faucs, 2001).

- *alterações microbiológicas e imunológicas*: os pacientes com FC não apresentam deficiência imune e, exceto para o trato respiratório, não são mais suscetíveis a infecções que indivíduos normais; a septicemia é raramente relatada. O mecanismo patogênico propiciando as infecções recorrentes e crônicas relacionam-se mais às alterações das secreções, formando muco viscoso e espesso que propicia o crescimento da flora patogênica. Infecções

respiratórias por vírus influenza A e B, adenovírus e especialmente vírus sincicial respiratório são responsáveis por algumas exacerbações agudas da doença pulmonar dos pacientes com FC (Hoiby, 1995). A função pulmonar pode cair em cerca de 30% nestes episódios. Os pacientes tornam-se suscetíveis à colonização secundária e à infecção bacteriana principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Quanto às infecções respiratórias bacterianas, os patógenos encontrados nos pacientes são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacea*. O *S. aureus* é um importante patógeno e é o mais freqüentemente isolado em crianças, porém não mais representa um grande problema pelo uso de antibióticos. *S. aureus* pode contribuir para o dano precoce das vias aéreas inferiores e predispor à infecção por *P. aeruginosa*, podendo em alguns pacientes, evoluir à infecção crônica. A *P. aeruginosa* é o patógeno prevalente, tornando-se endêmico em pacientes com FC em todos os países. Além de colonizar os pulmões, esta bactéria também coloniza os seios da face. Pacientes infectados por *P. aeruginosa* não disseminam a bactéria para outros membros da família não afetados, mas irmãos com FC freqüentemente carregam a mesma cepa, indicando contaminação da mesma fonte ambiental ou infecção cruzada, a qual parece ser a responsável pela prevalência variável desta espécie em diferentes centros. Infelizmente, o grande número de pacientes já está colonizado cronicamente na ocasião do diagnóstico. *P. aeruginosa* produz vários fatores de virulência e toxinas com efeito deletério para os pulmões de pacientes com FC. Já a *B. cepacea* é mais resistente a antibióticos e desenvolve-se mais rapidamente que a *P. aeruginosa*. Todas estas infecções, independentemente do patógeno responsável, quando recorrentes e persistentes, causam bronquites e insuficiência respiratória, podendo levar a morte.

1.5- CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO

A apresentação clínica, a gravidade da doença e a velocidade de progressão da FC variam consideravelmente e algumas variações podem ser devido à presença de diferentes combinações no *locus* da FC. Além do meio,

fatores epigenéticos ou genéticos podem contribuir para um quadro clínico de manifestação da doença (Porteous e Dorin, 1990).

As tentativas de correlação entre o genótipo e o fenótipo em FC são alvo de inúmeras investigações. Contudo, tem sido difícil estabelecer esta correlação por vários motivos: a) grande número de mutações raras que podem causar a doença; b) diferença do quadro clínico observado entre irmãos afetados; c) número pequeno de pacientes homozigotos para uma mutação (Raskin e Faucs, 2001).

De uma forma geral, pacientes homozigotos para mutações de terminação no quadro de leitura apresentam alterações pancreáticas graves, mas alterações pulmonares leves. As deleções de aminoácidos, como no caso da $\Delta F508$ e $\Delta I507$, são consideradas mutações precursoras de manifestações clínicas graves. Já as mutações de substituição de aminoácido podem estar associadas a um quadro clínico grave ou leve em pacientes portadores de FC (Kristidis *et al.*, 1992).

Mais de 1006 mutações foram descritas até o momento (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). No entanto, a mais comum é a $\Delta F508$. Pacientes homozigotos para esta mutação apresentam, em geral, um quadro clínico grave, com manifestação precoce dos primeiros sintomas. A insuficiência pancreática está presente em 99% desses casos e o íleo meconial atinge, em média, 33% (Kerem *et al.*, 1990a; Ferri *et al.*, 1995).

Os casos descritos demonstram a grande dificuldade em estabelecer uma relação exata entre genótipo e fenótipo, pois muitas variáveis devem ser consideradas para esta análise. Além disso, até mesmo entre irmãos afetados por uma mesma mutação, muitas vezes não se observa uma evolução clínica semelhante da doença (Reiss *et al.*, 1993).

Uma outra tentativa de correlacionar a mutação com o fenótipo é através da análise do efeito de uma mutação em seu polipeptídeo, ou seja, verificar qual o tipo de mutação e/ou em que domínio do gene essa mutação ocorreu. E então, predizer se a mesma está alterando a função, a síntese, a estrutura secundária ou terciária da proteína. Nesse sentido, foram propostos 4 mecanismos gerais (correspondente a 4 classes de mutações) que podem levar a uma disruptura da função da CFTR (Welsh, 1994).

As mutações da classe I levam a uma terminação prematura na tradução do gene. Essa terminação prematura da proteína pode ser causada por: mutações em sítios de terminação ou que causem mudança no quadro de leitura, ou ainda, mutações sem sentido (Tsui, 1992). Mutações da classe II causam um defeito no processamento da proteína, onde a glicosilação é apenas parcial, provocando a degradação precoce. Nessa classe encontramos a grande maioria das mutações da FC, incluindo a mais comum, a deleção $\Delta F508$ (Welsh e Smith, 1993). As mutações da classe III não provocam problemas no processamento da proteína, porém há um defeito na regulação do canal de cloro. Essas alterações ocorrem nos NBDs, causando uma diminuição na frequência de abertura do canal ou uma resposta anormal ao ATP (Anderson e Welsh, 1992). Finalmente, na classe IV, verificamos um defeito na condução de íons, onde um número de mutações nos MSDs produzem canais localizados corretamente e com regulação normal, porém, devido à formação anormal do poro do canal, a quantidade de cloro que atravessa a membrana está diminuída, geralmente em 1/3 da capacidade normal (Welsh e Smith, 1993) (figura 1.3).

Apesar das inúmeras dificuldades para se estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo, espera-se que os indivíduos da classe I e II tenham um quadro clínico grave, visto que há uma perda na localização celular correta da proteína. Assim sendo, mutações dessas classes são associadas com o fenótipo da IP grave, como, por exemplo, a $\Delta F508$ e a G542X (Welsh e Smith, 1993). Por outro lado, os das classes III e IV têm a proteína corretamente localizada, resultando em uma função residual ou anormal dessa proteína. Os indivíduos pertencentes à classe IV apresentam uma atividade residual do canal de cloro capaz de conferir-lhes um fenótipo de SP. Nessa classe, alguns indivíduos (R117H) assumem manifestações atípicas da FC, como apenas ACVD (Anguiano *et al.*, 1992). Na classe III encontramos indivíduos com SP (G551S) e IP (G551D), sugerindo a existência de um grau de regulação anormal dependendo da alteração molecular (Cutting *et al.*, 1990b; Strong *et al.*, 1991).

A gravidade desta doença genética pode ser determinada por outros loci modificadores que atuem diretamente sobre o fenótipo de FC, como os genes codificadores de muco. Um fator agravante do quadro clínico dos pacientes com

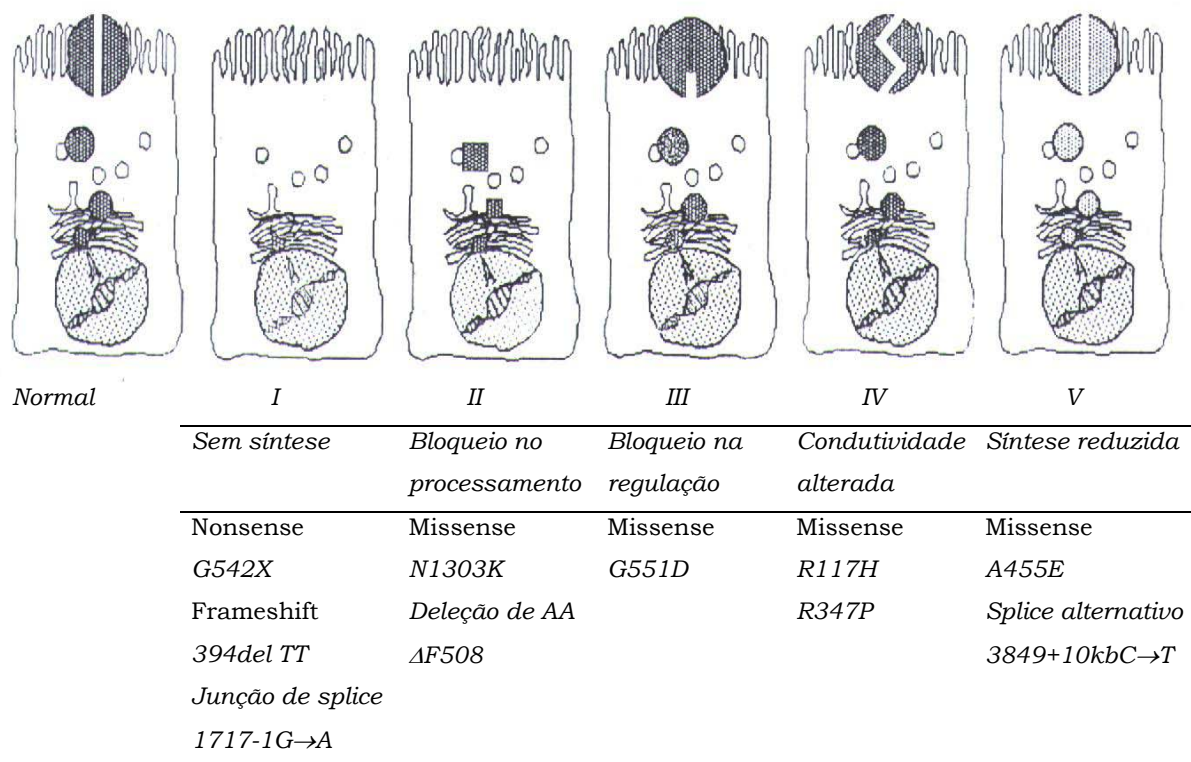


Figura 1.3: **Representação das cinco classes de mutações responsáveis por FC** (Reproduzido de Raskin e Faucs, 2001).

FC é a produção de muco, a qual é determinada por genes específicos para esta função.

Indivíduos heterozigotos para as mutações G551D e $\Delta F508$, comparando idade e sexo, foram estudados e relacionados com indivíduos homozigotos para $\Delta F508$. Neste estudo, foi constatado que além dos sintomas previamente identificados, a presença de íleo meconial nos indivíduos heterozigotos. Por outro lado, não foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, os quais mostraram respostas clínicas indistinguíveis (Hamosh et al., 1992).

De uma forma geral, a maioria das mutações relacionadas à FC está diretamente relacionada à IP, enquanto que aproximadamente 10% dos alelos mutados podem conferir ao paciente um quadro fenotípico de SP. O fenótipo SP ocorre em pacientes que têm uma ou duas mutações leves, como por exemplo a

R117H, a R334W, a R347P, a A455E e a P574H, enquanto que o fenótipo IP ocorre em pacientes que são homozigotos ou heterozigotos para 2 mutações graves como a $\Delta F508$, a $\Delta I507$, a Q493X, a G542X, a W1282X, a $621+1g \rightarrow t$, a $1717-1g \rightarrow a$, a 556delA, a 3659delC, a I148T, a G480C, a V520F, a G551D e a R560T. No que diz respeito à função pancreática, alelos com mutações leves conferem uma atividade residual mais alta da proteína CFTR do que os com mutações graves.

Já a mutação G542X quando presente em homozigotos apresenta formas mais leves do que a mutação $\Delta F508$ em homozigotos ou heterozigotos compostos $\Delta F508/G542X$. Da mesma forma, outros pacientes com mutações de terminação em ambos alelos podem ser menos comprometidos fenotipicamente do que os homozigotos para $\Delta F508$. Ou seja, se a mutação de terminação abolisse a produção de CFTR esta poderia ser menos prejudicial do que o mau funcionamento da proteína como a $\Delta F508$. Porém, isto tem sido um ponto de controvérsia (Harris, 1992).

As mutações R553X e W1316X foram detectadas em pacientes heterozigotos, em estudos prévios. Estes pacientes apresentavam um mRNA não detectável nas células brônquicas e do epitélio nasal, associados com doença pancreática grave mas doença pulmonar leve (Hamosh *et al.*, 1991). Ainda tentando estabelecer uma correlação genótipo/fenótipo, foi identificada uma criança que, apesar de ser homozigota para a mutação R553X, tinha apenas doença pulmonar leve (Cheadle *et al.* 1992). Além disso, um paciente homozigoto para a mutação R553X foi identificado. Este paciente foi afetado de forma moderadamente grave (Bal *et al.*, 1991). Sendo assim, foi atribuída a possibilidade da proteína CFTR nas células das vias respiratórias ser menos prejudicial do que a presença de uma proteína alterada (Cutting *et al.*, 1990a).

A mutação N1303K é uma mutação relacionada ao comprometimento pancreático, mas nenhuma correlação pode ser feita entre indivíduos homozigotos ou heterozigotos e a doença pulmonar grave, pois esta mutação foi encontrada exclusivamente em indivíduos heterozigotos (Osborne *et al.*, 1992).

A mutação R117H foi descrita em associação com um sítio polimórfico de timidinas no intron 8 do gene CFTR (Kieseweter *et al.*, 1993). Esse sítio se caracteriza pela presença de 3 alelos na população, sendo eles os alelos 5T (cinco

timidinas), 7T (sete timidinas)) e 9T (nove timidinas), o qual se localiza a 5 pares de base (pb) da primeira base do exon 9. O alelo 5T promove um processamento (*splicing*) inapropriado do mRNA, eliminando em torno de 70 a 95% do transcrito do exon 9; enquanto que os alelos 7T e 9T, variantes mais comuns, estão associados com os níveis mais altos do transcrito de comprimento normal (50-100% e >95%, respectivamente) (Chou *et al.*, 1993; Rave-Harel *et al.*, 1995). Uma frequência significativa do alelo 5T foi observada, o que sugere que crianças que apresentam níveis elevados de tripsina imunorreativa ao nascer podem ser heterozigotos compostos para $\Delta F508$ e IVS8-5T. A mutação IVS8-5T é freqüentemente encontrada em homens com infertilidade devida à ausência bilateral congênita de vasos deferentes (CBAVD). Indivíduos com uma mutação para FC em um cromossomo e o alelo 5T em outro apresentam pouca atividade proteica e seus fenótipos são muito variáveis, incluindo manifestações leves da doença, bronquiectasia, ausência de vasos deferentes e a ausência de problemas de fertilidade. Considerando a extensa variabilidade das manifestações associadas a este genótipo, torna-se extremamente difícil o diagnóstico clínico desses neonatos (Castellani *et al.*, 1997).

Como a apresentação da FC é complexa, a doença envolve múltiplos órgãos e os sintomas podem variar de acordo com cada paciente, correlações genótipo-fenótipo podem ser de muito valor para a melhor compreensão da função do CFTR e para o melhor diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes. Por outro lado, boas correlações entre o genótipo do paciente e o fenótipo apresentado pelo mesmo nem sempre podem ser estabelecidas com segurança. A correlação genótipo-fenótipo torna-se difícil para pacientes que apresentam o fenótipo clássico de FC ou para os pacientes com envolvimento pulmonar. No entanto, esta correlação é significativa para pacientes com FC portadores de IP, onde 85% dos pacientes apresentam uma ou duas mutações leves. Poucas mutações podem ser associadas com doença pulmonar leve e algumas mutações leves específicas estão presentes em homens com ausência bilateral congênita dos vasos deferentes sem FC clássica (Welsh *et al.*, 2001).

1.6- ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

Estudos eletrofisiológicos dos canais das glândulas salivares do epitélio das vias respiratórias apontam para um defeito básico no transporte dos íons cloreto e possivelmente de outros ânions através dos epitélios. As concentrações dos íons sódio e cloreto secretados nas glândulas sudoríparas dos pacientes com FC são normais. Entretanto, diferentemente das células epiteliais normais, as células de revestimento dos canais sudoríparos na FC são relativamente impermeáveis ao Cl^- . Portanto, à medida que o suor se movimenta para a superfície, a reabsorção do ânion Cl^- e do cátion Na^+ acompanhante deixa de ocorrer. Eis, então, o motivo pelo qual os pacientes com FC excretam no suor um excesso de cloreto de sódio, observação característica da patologia.

No trato respiratório, o transporte eletrolítico transepitelial controla a quantidade e a composição do fluido do trato respiratório. O epitélio normal das vias aéreas transporta ativamente o Cl^- da mucosa para a superfície. Na FC há uma diminuição da secreção dos íons cloreto no interior do lúmen, que induz, secundariamente, a uma redução do conteúdo de Na^+ no fluido luminal. Como o movimento da água é orientado pelo NaCl , o efeito da redução das secreções do Cl^- é a diminuição do conteúdo de água das secreções das vias aéreas. Esta diminuição do conteúdo aquoso é responsável pelo acúmulo de secreções viscosas hiperconcentradas que obstruem as vias aéreas e predis põem a infecções pulmonares recidivantes.

No pâncreas provavelmente também ocorre a diminuição da secreção de ânions. Entretanto, diferentemente dos fluidos respiratórios e do suor, o principal ânion secretado no canal pancreático é o bicarbonato e não o cloreto. Os pacientes com FC apresentam redução do conteúdo de bicarbonato (e de água) nas secreções pancreáticas. Uma vez que o Cl^- e outros íons, tais como HCO_3^{2+} , são transportados através das membranas celulares pelos canais de íons, na FC é provável que o distúrbio do transporte epitelial do ânion seja um defeito celular generalizado. Os mecanismos que regulam o transporte do Cl^- não estão completamente esclarecidos, porém existe evidência de que uma proteína captadora de cálcio, que é um componente integral de um complexo regulador, poderá estar em falta (Robbins, 1991).

1.7- FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL

Apesar do Brasil possuir uma enorme população caucasóide e uma grande miscigenação, aumentando teoricamente o número de casos de FC na população, a doença é muito pouco conhecida no país, até mesmo pelos profissionais da área da saúde. Acredita-se que a incidência da doença na população brasileira seja baixa, baseado no número de casos diagnosticados no país. Vários fatores podem estar contribuindo para esta baixa taxa de diagnóstico, dentre os quais: a) baixa frequência gênica na população brasileira; b) altas taxas de mortalidade infantil, cujas causas de morte “primária” seriam doenças pulmonares e gastrointestinais sintomas mais freqüentes da FC; c) óbito de grande parte dos afetados sem diagnóstico; d) dificuldade de acesso a testes diagnósticos; e) condições intrínsecas da doença, como a variabilidade de expressão das formas clínicas.

O somatório de fatores faz com que a média de idade ao diagnóstico no Brasil seja provavelmente alta, se comparada com a média de 7 meses nos países mais desenvolvidos, e que haja um intervalo de tempo provavelmente alto entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a confirmação do diagnóstico, se levado em conta apenas o grupo de pacientes em que o diagnóstico é feito. Se esse período de latência entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico for prolongado, é possível que grande parte dos pacientes esteja indo a óbito, e que outra parte deixe de receber qualquer conduta terapêutica ou esteja recebendo tratamentos inadequados, pois muitas vezes essas crianças podem estar sendo diagnosticadas erroneamente como tendo doenças prevalentes em nosso país, como asma, bronquite e tuberculose. Conseqüentemente, o grupo de crianças que chega ao diagnóstico no Brasil se apresenta ao médico já com quadro clínico bastante avançado, com lesões pulmonares graves e com desnutrição secundária importante, o que dificulta muito a terapêutica e piora o prognóstico e a sobrevida. Os únicos dados brasileiros existentes demonstram que a sobrevida média do paciente brasileiro com FC está próxima aos 11 anos de idade, média esta semelhante à encontrada nos países desenvolvidos antes de 1960 (Macri *et al.*, 1991; Reis *et al.*, 1998). Nos países desenvolvidos, 50% dos pacientes com FC nascidos hoje viverão, provavelmente, pelo menos até o ano de 2050, enquanto 50% dos

pacientes brasileiros nascidos hoje irão a óbito, provavelmente antes de 2010. (Raskin e Faucz, 2001).

Desde de 1990, diversos estudos vêm sendo realizados levando-se em consideração as bases moleculares de FC na população brasileira. Os resultados dos estudos realizados podem ser observados na tabela 1.3.

Uma análise epidemiológica e social das famílias afetadas no Estado do Rio Grande do Sul detectou que na composição étnica de 96% das famílias afetadas, encontram-se ascendentes caucasóides (Gaidzinski, 1992). O número estimado de portadores de FC é de 1:20 no RS (Raskin *et al.*, 1999), 1:56 em SC (Raskin *et al.*, 1999), 1:42 no PR (Raskin *et al.*, 1999), 1:90 em SP (Bernardino *et al.*, 2000) e 1:72 em MG (Reis *et al.*, 1998). A doença tem uma incidência estimada em 1:1587 em Porto Alegre (RS), 1:12048 em Florianópolis (SC), 1:6803 em Curitiba (PR), 1:32258 em São Paulo (SP) e 1:20408 em Belo Horizonte (MG). A frequência de mutações é bastante diferente em negróides brasileiros com FC, e em um painel de 70 mutações detecta apenas 22% dos alelos mutados (Raskin e Faucz, 2001). Uma triagem completa do gene CFTR na população brasileira está sendo realizado com o objetivo de identificar todas as mutações presentes na população caucasóide e na população negróide brasileira. Em um primeiro momento, já foram identificadas 8 novas mutações, sendo uma em um indivíduo caucasóide e todas as outras em indivíduos negróides (Faucz *et al.*, 2000).

1.8- DIAGNÓSTICO DE FC

A FC é uma doença multissistêmica apresentando uma grande variabilidade das manifestações clínicas (sintomas, sinais, idade de início e história familiar da doença). Apesar de manifestar-se por formas atípicas, alguns pontos comuns devem levantar a suspeita desta enfermidade, tais como: 1) história familiar da doença (o que ocorre em cerca de 20% dos casos) e/ou obstrução intestinal neonatal (íleo meconial, ocorrendo em cerca de 10% dos recém nascidos com FC); 2) dificuldade de ganho de peso adequado durante a infância, embora demonstrando um apetite voraz; 3) evacuações freqüentes de fezes oleosas, com odor intolerável; 4) tosse freqüente, repetitiva,

Tabela 1.3: **Resultados de estudos realizados no Brasil.**

Mutações	Frequência	Número de alelos estudados	Estado	Estudo
ΔF508	35%	34		De Miranda <i>et al.</i> , 1993
ΔF508	33%	48	SP	Martins <i>et al.</i> , 1993
ΔF508, G542X, N1303K, ΔI507, 1717-1G→A, W1282X, G551D, R553X	26,5%	34	RJ	Fernandes <i>et al.</i> , 1994
ΔF508	38%	240	SP	Ferri, 1995
G542X	8,3%			
N1303K	1,6%			
W1282X	0,8%			
ΔF508	31,7%	240	SP	Parizotto <i>et al.</i> , 1997
G542X	8,3%			
N1303K	2,5%			
G551D	-			
R553X	-			
ΔF508	47,7%	88	RJ	Cabello <i>et al.</i> , 1999
G542X	0,0227%			
G551D	0,0114%			
ΔF508	45%*	344	RS, SC, PR, SP, MG	Raskin <i>et al.</i> , 1999
G542X	10,6%*			
G551D	0,36%*			
R553X	1,34%*			
N1303K	4,38%*			
ΔF508, G542X, N1303K, G551D, R553X, R1162X, R334W, W1282X, G85E, L206W, 621+1G→T, V232D, R851L, 2347delG 1717-1G→A 2789+5G→A W1089X, V201M, Y275X, 2686insT, 3171delC, 3617delGA	72,2%	360	SP	Bernardino <i>et al.</i> , 2000

* Dados representativos da média dos 5 estados brasileiros avaliados.

com produção de catarro e/ou episódios de respiração difícil, tórax superinflado com sua ressonância aumentada e retração dos tecidos moles nas áreas supraclaviculares, supraexternal, intercostais e sub-costais; 5) prolapso retal; 6) doença hepática “inexplicável” (Campos et al., 1996).

A avaliação do paciente deve ser realizada com base em todos os dados disponíveis e em uma análise clínica global (Campos et al., 1996). Nesse sentido, os seguintes exames são úteis: 1) estado geral, imunológico e aferição de deficiências nutricionais; 2) avaliação do sistema respiratório (trato respiratório superior e inferior); 3) avaliação gastrointestinal (tubo digestivo e órgãos anexos); 4) testes de função pancreática exócrina (Welsh et al., 1995). Entretanto, a investigação diagnóstica funcional das doenças pancreáticas em geral e da FC em particular, envolvem dificuldades técnicas que impedem que ela seja colocada na rotina. Nas formas leves de IP tal investigação assume importante papel no diagnóstico diferencial.

Segundo Shwachman, duas atitudes são indispensáveis para a busca diagnóstica da FC: 1) Raciocínio clínico um alto grau de percepção voltada para a suspeita da enfermidade; 2) solicitar a PrS sem demora (Campos et al., 1996).

A hipótese diagnóstica de FC está baseada em sinais clínicos de doença obstrutiva pulmonar, infecções pulmonares persistentes, íleo meconial e insuficiência pancreática. O diagnóstico de FC além do período neonatal é baseado nos critérios clínicos cuidadosamente definidos, na análise dos níveis de cloreto no suor e, mais recentemente, no teste de DNA. Qualquer um dos critérios clínicos, se acompanhado por níveis de cloreto no suor acima de 60mEq/L, é suficiente para confirmar o diagnóstico de FC. Desde que, em 1959, foi demonstrado níveis elevados do íon cloreto no suor de pacientes com FC, este tem sido o principal método laboratorial de confirmação diagnóstica (Gibson e Cook, 1959). O procedimento de iontoforese pela pilocarpina deve ser realizado de forma meticulosa para evitar resultados falso-positivos de ordem de 40% (Le Grys e Hood, 1988). Falsos resultados podem ser obtidos pela coleta insuficiente de suor. São necessários pelo menos 50 mg de suor, coletados num período de 45 minutos (Raskin e Faucz, 2001).

Os níveis de eletrólitos no suor estão elevados desde os primeiros dias de vida. Entretanto, a coleta de quantidade insuficiente de suor em recém-

nascidos, é um problema freqüente. Outro fator importante a ser considerado, é que os níveis de eletrólitos no suor podem estar elevados nos primeiros dias de vida em recém-nascidos normais. Por esses motivos, o teste é geralmente realizado somente após o segundo mês de vida, mesmo quando há forte suspeita clínica, apesar da urgência do resultado (Raskin e Faucz, 2001).

Com a possibilidade do diagnóstico molecular, ficou claro que um número considerável de pacientes com FC possuem níveis intermediários de cloreto no suor (entre 40 e 60mE/L) e alguns possuem níveis normais (Kosztolanyi, Malik e Rutishauser, 1996).

Em FC existem muitos casos que não atendem rigorosamente a todos os critérios de diagnóstico desta doença. Existem prováveis definições clínicas de FC que podem estar ocultas em uma porcentagem significativa de pacientes que permanecem sem o diagnóstico na ausência da análise molecular no locus da FC (Harris, 1992). O diagnóstico molecular de FC está baseado na análise de mutações no gene CFTR, o qual pode ser utilizado tanto em diagnóstico pré-natal como na identificação de casos com suspeitas clínicas e detecção de portadores para esta doença.

Programas de triagem neonatal para FC utilizam a dosagem de tripsina imunorreativa (IRT) em amostras de sangue de recém-nascidos. Níveis séricos elevados de IRT seriam indicativos de FC. Entretanto, este marcador bioquímico não é específico, podendo estar alterado em outras situações patológicas (Welsh *et al.*, 2001). Isso faz com que as taxas de falso-negativos (2-10%) sejam altas para um programa de triagem populacional, tornando este teste, quando realizado isoladamente, inaceitável mesmo pelos centros com maior experiência. A taxa de falso-positivos no teste da IRT varia entre 0,2% e 1,6% (Gregg *et al.*, 1993).

Sendo assim, o diagnóstico preciso de FC possui relevante importância na área médica uma vez que esta doença associa-se à maior causa severa e progressiva de distúrbios pulmonares em crianças. Nos últimos tempos, a FC vem sendo relacionada como uma importante causa de doenças respiratórias, as quais são responsáveis por um índice elevado de mortalidade em jovens adultos. Dentro deste contexto, a utilização de métodos moleculares associado à dosagem bioquímica é de grande importância, pois proporciona a

confirmação laboratorial de portadores de FC com significativa eficácia. Logo, é de suma importância que os testes de detecção e identificação molecular sejam amplamente utilizados, pois permitem uma maior sensibilidade e especificidade, com a vantagem de ser necessária apenas uma pequena amostra de sangue do recém-nascido. Além disso, pode ser empregado para detecção de portadores em famílias de risco para FC.

Com os progressos recentes na patogênese da FC, sua caracterização clínica vem sendo correlacionada ao gene CFTR e ao potencial grau de patogenicidade da mutação em foco. As alterações genéticas relacionam-se diretamente aos aspectos fenotípicos e à gravidade da doença. Por isso, a correlação genótipo/fenótipo vem sendo intensamente investigada sem que outros fatores, como o ambiente e o estado nutricional, sejam menosprezados.

Em suma, para um adequado diagnóstico de FC é necessária uma análise isolada de cada setor afetado - com suas características próprias - e, em seguida, ao exercício de síntese de uma imagem clínica global típica de uma doença multissistêmica.

Parte 2

JUSTIFICATIVA

A implantação de um protocolo de investigação com técnicas de biologia molecular para a caracterização das mutações e a identificação de pessoas portadoras de mutações no gene da FC se justifica pelas seguintes razões:

❶ A FC é a doença gênica autossômica recessiva mais comum em caucasóides, apresentando uma alta frequência mundial, podendo afetar aproximadamente 50.000 crianças e jovens adultos em todo o mundo (Colledge, 1994);

❷ No Brasil, país com altas taxas de miscigenação racial, e onde ainda poucos estudos moleculares e epidemiológicos foram realizados, estimando-se que seja também elevada a ocorrência de casos de FC;

❸ O método bioquímico utilizado para diagnóstico da FC, uma doença clinicamente heterogênea e de difícil diagnóstico, apresenta dificuldade de aplicação, além de apresentar um elevado percentual de falsos resultados, sendo que o uso de métodos moleculares pode aumentar a eficiência dos protocolos diagnósticos;

❹ O diagnóstico precoce do paciente pode contribuir para a melhora da sua qualidade de vida;

❺ Sendo a FC uma doença com quadro clínico complexo, a avaliação de polimorfismos moleculares pode contribuir para melhor compreensão dos fatores relacionados com o fenótipo;

❻ Finalmente, a elevada frequência da FC em populações caucasóides, altamente representadas no sul do Brasil, torna recomendável que um estudo como este seja conduzido nesta região.

Parte 3

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

① Identificar alterações nas seqüências de nucleotídeos dos exons 3, 4, 5 e 7 do gene CFTR, os quais localizam-se no primeiro domínio de expansão de membrana (MSD1); dos exons 11 e 12, localizadas no primeiro domínio de ligação de ATP (NBD1); e dos exons 19, 20 e 22 que se encontram no segundo domínio de ligação de ATP (NBD2) do gene CFTR;

② Identificar algumas mutações tidas como prevalentes no gene CFTR (R347P, R347H, R334W, Q359K, S549N, R1162X e W1282X] e estimar a freqüência destas mutações na amostra estudada;

③ Determinar o genótipo dos pacientes com FC analisados complementando o estudo anteriormente realizado na mesma amostra;

④ Estabelecer um protocolo rápido e eficiente para identificar as alterações de politimidinas em pacientes não homozigotos para a mutação $\Delta F508$;

⑤ Estabelecer a freqüência dos alelos 5T, 7T e 9T nos pacientes com FC do sul do Brasil;

⑥ Estabelecer a correlação do polimorfismo politimidinas com algumas manifestações clínicas da doença, como a azoospermia.

Parte 4

RESULTADOS

	Pg.
4.1- ARTIGO I: <i>CFTR</i> GENE: MOLECULAR ANALYSIS IN PATIENTS FROM SOUTH BRAZIL (Streit <i>et al.</i> , 2003)	35
4.2- ARTIGO II: MOLECULAR ANALYSIS OF A VARIABLE LENGTH POLYTHIMIDINE TRACT IN THE <i>CFTR</i> GENE OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS FROM SOUTH BRAZIL (Artigo submetido para a revista <i>American Journal of Medical Genetics</i>)	41

CFTR GENE: MOLECULAR ANALYSIS IN PATIENTS FROM SOUTH BRAZIL

Carla Streit^{1, 2}, Antônio Carlos Burlamaque-Neto¹, Fernando de Abreu e Silva³, Roberto Giugliani^{1, 4}, Maria Luiza Saraiva Pereira^{1, 2}.

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³Pneumology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: CFTR Gene: Molecular Analysis in Brazil

Address Correspondence to:
Maria Luiza Saraiva Pereira, PhD
Medical Genetics Service
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil
Tel: + 55 51 33168011
Fax: + 55 51 33168010
E-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is the most common genetic disease among Caucasians. The CF gene, named cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*), codifies a protein that acts as a channel through the epithelial membrane. The present work aimed (1) to detect sequence alterations in the nucleotide binding regions and at the membrane spanning domain of the *CFTR* gene, and (2) to detect the following frequent mutations R347P, R347H, R334W and Q359K (located in exon 7), Δ F508 (located in exon 10), G542X, G551D, R553X and S549N (located in exon 11), W1282X (located in exon 20) and N1303K (located in exon 21). Seventy seven unrelated CF patients were analyzed, who were previously diagnosed and currently under treatment at the Pneumology Service of our hospital. Regions of interest were amplified by PCR using specific primers. Each sample was analyzed by a non-radioactive single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis technique and restriction enzyme digestion. The Δ F508 mutation was found in 48.7% of the alleles. Frequencies of G542X, R334W, R553X and W1282X mutations in our population were 3.25%, 1.3%, 0.65% and 0.65%, respectively. No alleles were found to carry mutations G551D, R334W, R347P, R347H, Q359K, S549N and N1303K, which were included in the screening protocol. This study allowed the characterization of 84 out of 154 CF mutant alleles (54.5%). The incidence of main CF mutations analyzed was similar to that of the South European population. Mutation data presented here will be useful for designing new DNA testing strategies for CF in South Brazil.

Key words: cystic fibrosis, mutations, *CFTR* gene, molecular analysis, South Brazil

INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is one of the most common autosomal recessive diseases of Caucasian population. CF is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene [1, 2, 3, 4]. More than 900 mutations in the *CFTR* gene which encodes a chloride channel located in the apical membranes of the epithelial cell have been identified in the CF patients. Despite this diversity, most individuals with CF carry at least one *CFTR* allele whose product is synthesized but fails to mature or to proceed beyond the endoplasmic reticulum (ER) within the cell. The main defect in the CF disease is the impermeability of the ion sodium and chloride.

The most common CF mutation, named $\Delta F508$, is a 3bp deletion that encodes a phenylalanine in the position 508 of protein. This major mutation accounts for 66% of CF chromosomes worldwide (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). The $\Delta F508$ has a variable frequency in patients among different geographic regions, accounting for 50-88% in West European countries [5] and less than 30% in the Middle East (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). At present, there is little information about the molecular basis of CF from Latin American countries. $\Delta F508$ mutation was reported with an overall frequency of 45% (<http://www.genet.sickkids.on.ca>), ranging from 29% in Chile to 62% in Argentina (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) [6].

Four other mutant alleles for CF occur at a relative frequency greater than 1%; however, some mutations are unusually common in

specific populations, such as W1282X among Ashkenazi Jews [3]. CF studies suggest that a high number of CF mutations are present in Brazilian patients [7, 8], most of them are very rare.

Several studies have shown that the earlier a patient with CF is diagnosed and treated, the greater the life expectancy of this patient [9, 10, 11]. To address this question, we have investigated the prevalence of the main mutation, $\Delta F508$, and other frequent mutations in CF patients previously diagnosed based on clinical data and sweat chloride test.

The main aims of the present work were: (1) to establish the frequency of the $\Delta F508$ mutation in this studied population, (2) to identify alterations in the nucleotide sequence of the exons 3, 5, and 7 which are located in the first membrane spanning domain (MSD1); of exons 9, 10, 11, and 12 which are located in the first nucleotide binding domain (NBD1); of exons 19, 20, 21, and 22 which are located in the second nucleotide binding domain (NBD2) of the *CFTR* gene, and finally (3) to identify some specific frequent mutations (R347P, R347H, R334W, Q359K, G542X, G551D, R553X, S549N, W1282X and N1303K) in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Sample characterization

We have studied 77 unrelated CF patients that were born in the South region of Brazil. These patients were previously diagnosed by the Pneumology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CF diagnosis was based on both abnormally elevated sweat electrolyte concentrations ($>60\text{mEq/l}$) and typical clinical features. Main clinical findings were chronic asthma, obstructive airway disease, repeated bronchopneumonia, chronic diarrhea, steatorrhea, and failure to thrive. Although males predominate, gender distribution was not statistically different, as expected for an autosomal recessive disease, being 39% female and 61% male. The majority of these patients (72.7%) was diagnosed in the first years of live (≤ 36 months). Twelve patients out of 77 had known CF history in their family.

Methodology and molecular analysis

DNA extraction

Blood sample (10mL) was collected in a tube containing 0.054mL of EDTA. Genomic DNA was extracted using the salting out technique, as previously described [12]. DNA was purified using isopropanol precipitation when necessary.

PCR reaction

Eleven regions of the *CFTR* gene were amplified by PCR using specific oligonucleotide primers. The general procedure and the specific nucleotide primers used for the amplification of individual exon sequences have been published previously [13]. Table 1 show primers designed to be used in this study.

PCR was carried out in a total volume of 25 μ l containing 0.2mM dNTPs, 10mM Tris HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 25 μ mol of each primer, 1.25U Taq DNA polymerase, and 200ng of DNA. Amplification was carried out in a MJ Research PTC 100 thermocycler with 5 min of initial denaturation at 94°C, then 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C (for exons 20 and 21) or 57°C (for exon 9) or 58°C (for exons 7, 10 and 19) or 60°C (for exons 3, 11, 12 and 22) or 62°C (for exon 5) or 63°C (for exon 19); and 1 min of extension at 72°C (or 3 min for exon 11), followed by a final extension at 72°C for 5 min. One fifth of the PCR reaction was analyzed by electrophoresis, and visualized by ethidium bromide staining.

Detection of the Δ F508 mutation

The Δ F508 mutation was detected by resolving exon 10 PCR product onto an 8% (w/v) non-denaturing polyacrylamide gel (29:1 acrylamide:bis-acrylamide), followed by ethidium bromide staining. This method resolves the three-base-pair difference in length between wild-type and mutant PCR product, as well as the heteroduplex bands formed in both products are present in the heterozygous state [14].

Single stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis

Samples were amplified by PCR and products were submitted to SSCP analysis [15, 16]. An aliquot of 6 μ L of each PCR product was mixed with 0.25% (w/v) bromophenol and 0.25% (w/v) xylene cyanol, and DNA was denatured at 99°C for 10 minutes. Samples were loaded onto a MDE[®] gel, following manufacturer instructions. Electrophoresis was performed at 5W for 16 to 33 hours at room temperature according to the specific length of amplified fragment. Protocol for silver staining of DNA was based on fixing step for 5 min in 10% (v/v) ethanol solution, oxidizing step for 3 min at 1% (v/v) nitric acid solution, and rinsing step for few seconds in water, staining step for 20 min in 0.012M silver nitrate solution, rinsing at deionized and depured water (few seconds), developing solution using 0.28M sodium carbonate and 0.019% formaldehyde, stop solution using 10% acetic acid (2 minutes), rinsing at deionized and depured water (few seconds), shrink the gel using 50% ethanol (30 minutes) and dry the gel [17].

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Mutations R347P, R347H, R334W, Q359K (located in exon 7), G542X, S549N, G551D, R553X mutations (exon 11), W1282X (exon 20) and N1303K (exon 21) were identified by RFLP protocol, using specific restriction endonucleases. G551D and R553X mutations were detected by a combined RFLP using *HincII* and *MboI* as described previously [18, 19]. RFLP using *BstNI* was used to detect the G542X mutation, because this alteration destroys the recognition site for this enzyme.

The Amplification Created Restriction Site (ACRS) was used to identify the N1303K mutation as previously described by Haliassos [20]. Using a modified primer on the 3' side of codon 1303, the N1303K mutation could be detected as a loss of a *Bst*NI recognition site [21]. W1282X mutation was also detected by RFLP. PCR product of exon 20 has two *Mn*II sites, one of which is destroyed by the W1282X mutation [22]. Positive controls were used along with samples to be tested for G542X, G551D and R553X mutations during the experiments.

Statistical analysis

Results were analyzed by ANOVA package or Chi-square test for comparison between the CF mutations frequencies observed in this population. P-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Detection of the $\Delta F508$ mutation showed that 75 (48.7%) out of 154 unrelated CF alleles from patients of the South region of Brazil carry this alteration. Twenty-four (31.2%) patients were homozygous for this mutation, while 27 (35.1%) were heterozygous, and 26 (33.8%) do not carry the $\Delta F508$ mutation.

Patients who are heterozygous for the $\Delta F508$ mutation and patients who do not carry this mutation were submitted to SSCP analysis of the exons 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 19, 20, 21 and 22. Using this approach, we covered 40.7% of coding regions of CF gene. Twenty-one patients out of 53 were identified to carry alterations in the sequence of the CFTR gene. These patients were further submitted to RFLP analysis in order to detect ten specific mutations located in 5 different regions of the CFTR gene. The overall frequencies obtained are shown in the table 2.

Screening of four additional mutations (G542X, R553X, R334W and W1282X) together with $\Delta F508$ enabled the characterization of 84 CF alleles (54.5%) and the complete genotype of 29 CF patients (37.7%).

This study allowed the establishment of the following genotype in CF patients analyzed. Twenty-four patients (31.2%) were homozygous for $\Delta F508$ mutation ($\Delta F508/\Delta F508$). Twenty-two patients (28.6%) were a compound heterozygous for $\Delta F508$ and an unknown mutation ($\Delta F508/?$). Three patients (3.9%) carry the G542X mutation in only one allele and an unknown mutation in the other (G542X/?). Two patients (2.6%) were a compound heterozygote for the $\Delta F508$ and the G542X mutation ($\Delta F508/G542X$). One

patient (1.3%) was a compound heterozygous compound for $\Delta F508$ and R553X mutation ($\Delta F508/R553X$). One patient (1.3%) was a compound heterozygote for $\Delta F508$ and R334W mutations ($\Delta F508/R334W$). One patient (1.3%) was a compound heterozygote for $\Delta F508$ and W1282X mutations ($\Delta F508/W1282X$). One patient (1.3%) had in one allele the R334W mutation and in other allele an undetected mutation (R334W/?). Finally, twenty-two patients (28.6%) have undetected mutations in both alleles.

Using the SSCP protocol, no abnormal patterns were found in exons 3, 5, 12 and 22. The distribution of abnormal patterns was as follows: 7 mutant alleles in exon 7, 1 mutant allele in exon 9, 6 in exon 11, 2 in exon 19, 3 in exon 20 and finally 2 in exon 21. We could not identify alterations in exon 10 due to the presence of $\Delta F508$ mutation and many polymorphisms in this region.

DISCUSSION

The Brazilian Caucasian population is not ethnically homogeneous: while in the Northern states the Portuguese contribution prevails, different waves of immigration from other European Countries have caused a higher ethnic diversity in the Southern regions [23]. CF incidence is expected to have regional differences due to the different patterns of racial mixture, immigration and selection pressure [24]. In a previous study, the incidence of CF in Rio Grande do Sul state was estimated as 1:2,500 live-births. An analysis of the distribution of different mutations in a population is essential for risk calculation when couples at risk ask for genetic counseling.

The ethnic origin of inhabitants from the South region of Brazil is heterogeneous and geographically unevenly distributed. The diversity of *CFTR* mutations has raised questions regarding the feasibility of CF carrier screening in heterogeneous populations. In Brazil, a country of a great racial admixture, the reported frequency of $\Delta F508$ mutation was previously established at 47%. Frequency of $\Delta F508$ mutation was observed to vary from 27 to 53% among states in Brazil, which are significant differences. On the other hand, estimated frequencies of G542X, N1303K and W1282X mutations among alleles of affected patients in our population were 8.35%, 1.6% and 0.8%, respectively [26].

Frequencies of $\Delta F508$, G542X, G551D and R553X mutations in our study were similar to that established for South Europe [27]. This finding was not surprising since the origin of the South Brazilian population

predominantly consists of immigrants from that part of Europe, mainly from German, Italy and Spain [24].

The mean frequency of $\Delta F508$ in alleles of Brazilian CF patients was established to be 49% [7] and 48.4% [28]. This frequency varies among different states, being 53% in Minas Gerais, 52% in São Paulo, 49% in Rio Grande do Sul, 44% in Paraná and 27% in Santa Catarina. Other authors reported frequencies of the $\Delta F508$ mutation in Brazil to be 50.8% in Rio Grande do Sul [29], 35% in Rio de Janeiro [30, 31] and 33% in São Paulo [28, 32], but some of these studies involved a limited number of patients. The proportion of $\Delta F508$ in Brazil is lower than that observed in the United States and England (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). As expected, frequencies found in Portugal, Spain and Italy are similar to those found in Brazil, due the colonization of Brazil by Southern Europeans [7]. Frequency of $\Delta F508$ mutation in our sample (48.7%) was similar to that found in a previous studies ($p > 0.05$) [7, 28]. Frequency of this mutation in Rio Grande do Sul is statistically different ($p < 0.05$) from frequency established in Santa Catarina state, although both are geographically very close, that confirms population heterogeneity of our country and the importance of regional molecular studies all over the country.

The G542X and R553X mutations showed frequencies similar to those observed in South European countries (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) [25]. In the present study, the G551D and N1303K mutations were investigated but no alleles with these

mutations were found, suggesting that they are not very common in this part of Brazil.

DNA screening for four common CF mutations (G542X, R553X, R334W and W1282X), together with $\Delta F508$, enabled the detection of 84 out of the 154 CF alleles in our sample, that represents 54.5% of studied alleles.

The molecular diagnosis would be helpful as an additional instrument aiming an early diagnosis and treatment of CF patients, which has been shown to be important for increasing the quality of life and reduce frequency of hospitalization [9, 10, 11]. This is particularly important in countries such as Brazil where most CF cases remains and probably dies undiagnosed, mainly in families of low social-economical status. In addition, early diagnosis is important for prevention since many “at risk” couples have a second affected child before they know they are at risk.

Therefore, molecular analysis along with neonatal screening and sweat chloride test can be powerful tools for precise identification of CF patients. However, mutation frequencies can vary among different regions of Brazil, so regional studies should be performed. This paper presents the broadest study made so far on CF mutations in South Brazil, being an important tool to allow diagnosis, carrier screening and prenatal diagnosis of CF in this part of Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Associação Gaúcha de Assistência à Mucoviscidose (AGAM), parents and patients who allowed this study and to the Pneumology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The authors would also like to thank Prof. Ann Harris for helpful discussion.

This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq, FAPERGS, PRONEX and FIPE-HCPA).

ELETRONIC-DATABASE INFORMATION

<http://www.genet.sickkids.on.ca> - CFGAC Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium.

REFERENCES

- [1] Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JÁ, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, Buchwald M, Tsui L-C (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.
- [2] Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
- [3] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
- [4] Welsh MJ, Ranzey BW, Accurso F, Cutting GR (2001). Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York, McGraw-Hill, pp. 5121-5173.

-
- [5] Tsui L-C, Buchwald M (1992) Cystic fibrosis. *Ann Med Genet* 24: 192-245.
- [6] Rios J, Orellana O, Aspillaga M, Avendano I, Largo I, Riveros N (1994) CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 94: 291-294.
- [7] Raskin S, Phillips III J. A, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Pilotto RF (1993) DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 46: 665-669.
- [8] Raskin S, Philips IIIJA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Dawson E, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Culpi L (1997) Regional distribution of cystic fibrosis – linked DNA haplotype in Brazil: multicenter study. *Hum Biol* 69: 75-88.
- [9] Faraguna D, Giglio L, D’Orazio C, Pederzini F, Venderweis U, Mastella G (1991) Is clinical status at diagnosis a prognostic factor in CF infants identified by neonatal screening? *Ped Pulmon Supp*, 7: 46-51.
- [10] Weaver LT, Green MR, Nicholson K, Mills J, Heeley ME, Kuzemko JÁ, Austin S, Gregory GA, Dux AE, Davis JÁ (1994) Prognosis in cystic

fibrosis treated with continuous fluoxacillin from the neonatal period.
Arch Dis Child 70: 84-90.

- [11] Balnaves ME, Bonacquisto L, Francis I, Glazner J, Forrest S (1995) The impact of newborn screening on cystic fibrosis testing in Victoria, Australia. *J Med Genet* 32: 537-542.
- [12] Miller AS (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- [13] Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B-S, Grzelczak Z, Riordan J, Rommens J, Tsui L-C (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:214-228.
- [14] Shrimpton AE, McIntish I, Brock DJH (1991) The incidence of the different cystic fibrosis mutations in the Scottish population: effects on prenatal diagnosis and genetic counseling. *J Med Genet* 28: 317-322.
- [15] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-70.

-
- [16] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989b) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- [17] Budowle B, Chakaborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144.
- [18] Cutting GR, Kash LM, Rosenstein BJ, Tsui L-C, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE (1990a) Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *New Eng J Med* 323: 1685-1689.
- [19] Cutting GR, Kash LM, Rosenstein BJ, Zielenski J, Tsui L-C, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr (1990b) A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* 346: 366-369.
- [20] Haliassos A, Chomei JC, Tesson L, Baudis M, Kruh J, Kaplan JC, Kitzis A (1989) Modification of enzymatically amplified DNA for detection of point mutations. *Nucleic Acids Res* 17:3606.
- [21] Ng ISL, Pace R, Richard M, Kobayashi K, Kerem B-T, Tsui L-C, Beaudet AL (1991) Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Genet* 87: 613-617.

-
- [22] Soshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, Rivlin Y, Tal A, Seret H, Yaar I, Kerem E, Kerem B-S (1992) Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish Cystic Fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet* 50:222-228.
- [23] Salzano FM, Freire-Maia N (ed) (1967) *Populações Brasileiras: Aspectos Demográficos, Genéticos e Antropológicos*. Companhia Editora Nacional, São Paulo, SP.
- [24] Pereira L, Raskin S, Freund AA, Ribas P, Castro R, Pignatti P, Culpi L (1999) Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA→G in two southern Brazilian states. *Gen and Mol Biol* 22 (3): 291-294.
- [25] Raskin S, Philips III, Kaplan G, McClure M, Vnencak-Jones C, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Pereira L, Faucz F, Gabardo J, Culpi L (1999) Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. *Hum Biol* 71: 103-113.
- [26] Estivill X, Bancells C, Ramos C, and Biomed CF Mutation Analysis Consortium (1997) Geographic Distribution and Regional Origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations. *Hum Mutat*, 10:135-154.

-
- [27] Maróstica PJ, Raskin S, Abreu FA (1998). Analysis of the delta F508 mutation in Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res* 31: 529-532.
- [28] Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, Damasceno N, Zatz M (2000) Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test* 4: 69-74.
- [29] Raskin S, Philips IIIJA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Culpi L (1997b) Cystic fibrosis in the Brazilian population: DF508 mutation and KM-19 / XV-2C haplotype distribution. *Hum Biol* 69: 499-508.
- [30] de Miranda AB, Llerena Junior J, Dallalana LT, Moura-Neto RS, Suffys PN, Degrave WM (1993) Use of PCR for the determination of the frequency of deltaF508 mutation in Brazilian cystic fibrosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88:309-312.
- [31] Cabello GM, Cabello EH, Jr JL, Fernande O, Harris A (2001) The 3120+1G>A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol* 73 403-409.

- [32] Martins CS, Ribeiro F, Costa FF (1993) Frequency of the cystic fibrosis delta F508 mutation in a population from São Paulo State. *Braz J Med Biol Res* 26: 1037-1040.

Table 1

Novel primers used in this study.

Exon	Primer Name	Sequence (5'→3')	Amplicon
7	CF7A	GATCTTCCATTCCAAGATCCC	358bp
	CF7B	ATCATAGTATATAATGCAGC	
10	CF10A	CTGAGCGTGATTTGATAATG	375bp
11	CF11A	CATTAGAAGGAAGATGTGCC	389bp
12	CF12A	CATCTACACTAGATGACCAGG	187bp
	CF12B	GCATGAGCATTATAAGTAAGG	
22	CF22A	CTCTGTGGTATCTGAACTATC	264bp
	CF22B	GGCATAATGATTCTGTTC	

Table 2

Mutations detected in 77 CF patients from South region of Brazil.

Mutation	Location	Number of Alleles	Frequency (%)
R334W	Exon 7	2	1.3
R347P	Exon 7	0	0
R347H	Exon 7	0	0
Q359K	Exon 7	0	0
ΔF508	Exon 10	75	48.7
S549N	Exon 11	0	0
G542X	Exon 11	5	3.2
G551D	Exon 11	0	0
R553X	Exon 11	1	0.7
W1282X	Exon 20	1	0.7
N1303K	Exon 21	0	0
?		70	45.4
TOTAL		154	100.0

? Indicates mutations not identified in this study.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE VARIABLE LENGTH POLYTHYMIDINE
TRACT IN THE *CFTR* GENE OF CYSTIC FIBROSIS PATIENTS FROM
SOUTH BRAZIL

Carla Streit^{1,2}, Antônio Carlos Burlamaque-Neto¹, Haley Calcagnotto¹,
Fernando de Abreu e Silva³, Roberto Giugliani^{1,4}, Maria Luiza Saraiva
Pereira^{1,2}.

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

³Pneumology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: Molecular analyses in Brazilian CF patients

CFTR Gene: Molecular Analysis in Brazil

Correspondence to:

Maria Luiza Saraiva Pereira, PhD
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP 90035-003 – Porto Alegre – RS
Brazil

Tel: + 55 51 3316-8011 / 3316-8309

Fax: + 55 51 3316-8010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is the most common genetic disease among Caucasians. The CF gene, named cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), codifies a protein that acts as a channel through the epithelial membrane. There are several factors involved in the CF disease. One of them is a polythymidine (polyT) polymorfism in the CFTR gene, which was not previously studied in our region.

The polyT tract in intron 8 of CFTR gene exists in three variants, 5T, 7T, and 9T. The 7T and 9T variants generate a predominantly normal transcript, whereas the 5T variant engenders an anomalous product. The analysis of the polyT tract is assuming increasing relevance, both to access the implication of the CFTR gene in congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), and to evaluate genotype-phenotype correlation in CF. The present work aimed to determine presence of 5T, 7T and/or 9T alleles in CF patients from South Brazil and to establish frequencies of these alleles in our patients.

Fifty-four CF unrelated patients composed our sample; all patients were previously diagnosed and are currently under treatment. DNA from these patients were extracted and regions of interest were amplified by PCR using specific primers. Frequencies of polyT alleles were established to be 1.85% for 5T, 60.18% for 7T and 37.96% for 9T. Genotype 5T/7T was detected in 2 patients, genotype 9T/9T was present in one patient, 13 patients were homozygous for allele 7T, and genotype 7T/9T was found in 39 patients.

Key words: cystic fibrosis, CFTR, polythymidines, Brazilian population

INTRODUCTION

Cystic fibrosis is an inherited disease, being the most common genetic disorder of the exocrine pancreas (Cohn *et al*, 1998). CF is the most common autosomal recessive disease in Caucasian population. CF is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a chloride channel located in the apical membranes of the epithelial cell (Kerem *et al*, 1989; Rommens *et al*, 1989; Welsh *et al*, 2001). On the molecular level, the defect in CF is caused by mutations affecting CFTR function through different mechanisms, such as lack of protein synthesis, incomplete intracellular processing and maturation, defective regulation and ion conductance. Up to date more than 1000 mutations in the CFTR gene have been identified in the CF patients (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

Mutations in the CFTR gene leads to dysfunction of several organs, including lung, sweat glands, vas deferens, and pancreas. Lung disease accounts for the most common complications and deaths related to CF. In patients with mild lung impairment, CFTR mutations cause one type of male infertility: congenital (bilateral) absence of the vas deferens (CBAVD) (Cohn *et al*, 1998).

The complex genotypes responsible for the variability of CF expression may have a similar impact on the clinical heterogeneity observed with CFTR mutations. A full understanding of the role of intron 8 polythymidine tract in disease expression includes to determine its impact on CFTR when it is not associated with known mutations. CBAVD is associated with at least two

different backgrounds defined by a polymorphic tract of thymidines in intron 8 (Kiesewetter *et al*, 1993). This three allele system of 5, 7 or 9 thymidines is located 5 base pairs (bp) upstream of exon 9. The 5T allele promotes inappropriate splicing of the CFTR mRNA, eliminating exon 9 in approximately 70 to 95% of transcripts, whereas the 7T and 9T alleles are associated with higher levels of normal length transcript (50 to 100% and more than 95%, respectively) (Chou *et al*, 1993; Rave-Harel *et al*, 1995). The 5T allele has a frequency of approximately 5% in the general population but its prevalence in CBAVD men increases to 21 to 30% among alleles that lack CFTR mutations. However, 5T/5T homozygotes have been reported who do not exhibit typical CF clinical features or to exhibit the CBAVD phenotype either with or without pancreatic or sinopulmonary problems, which argues against 5T being a fully penetrant mutation (Friedman *et al*, 1997). The 5T allele in intron 8 of the CFTR gene reduces the level of functional CFTR and is associated with inherited form of infertility in males (Cohn *et al*, 1998). This variant reduces the efficiency of exon 9 splicing and then reduces the expression of functional CFTR in patients who have a mutation that causes CF on one chromosome and the 5T allele on the other chromosome. In contrast, when the 7T or 9T allele are present, there are sufficient levels of properly spliced CFTR and these alleles do not cause CBAVD ducts. The length of the thymine tract in the site affects the splicing efficiency of exon 9, with 9T being most efficient (95% of complete CFTR mRNA) followed by 7T variant (50 to 90%) and by 5T variant (8 to 10%) (Patrizio and Zielensky, 1996).

An estimated 5 to 7% of the male population suffers some form of infertility. About 1.5% of male infertility and up to 25% of all obstructive

azoospermia are represented by CBAVD, a disorder characterized by regression of the deferent ductal system of the male genital tract. The majority of CF men are sterile, secondary to obstructive azoospermia, due to abnormalities of Wolffian duct derivatives (epididymis, vas deferens and seminal vesicles) resembling similar anatomical abnormalities observed in CBAVD in isolation (Patrizio and Zielensky, 1996). The variability in clinical picture relates to the variability of splicing of exon 9 since mRNAs lacking exon 9 generate CFTR proteins without chloride channel activity (Friedman *et al*, 1997).

We have previously investigated the prevalence of the main mutation, $\Delta F508$, and other frequent mutations in CF patients previously diagnosed based on clinical data and sweat chloride test.

The main aim of the present work was to establish the frequency of the 5T, 7T and 9T allele in CF patients from South Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Sample characterization

We have studied 54 unrelated CF patients born in the South region of Brazil. These patients have been previously diagnosed and are currently on treatment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CF diagnosis was based on both abnormally elevated sweat electrolyte concentrations ($>60\text{mEq/L}$) and typical clinical features. Main clinical findings were chronic asthma, obstructive airway disease, repeated broncopneumonia, chronic diarrhea, steatorrhea, and failure to thrive. The sample included 33 males and 21 females (predominance of males was not statistically significant). The majority of these patients (72.7%) was diagnosed in the first years of life (≤ 36 months). Positive family history of CF was observed in 15% of cases. Samples from 31 heterozygous for $\Delta F508$ mutation and from 23 patients who do not present the $\Delta F508$ mutation were studied to explore the association between different CFTR mutations and polythymidine alleles.

Methodology and molecular analysis

Blood sample (10mL) was collected in a tube containing EDTA. Genomic DNA was extracted using the salting-out technique, as previously described (Miller *et al*, 1988). The length of the sequences of thymidines in intron 8 of the CFTR gene was determined with three allele-specific polymerase chain reactions (PCR) per sample, using previously

described primers (Zielensky et al, 1991; Friedman, 1997). PCR was carried out in a total volume of 25µl containing 0.2mM dNTPs, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 25µmol of each primer and 100ng of genomic DNA. Amplification specificity was reached using the TaqStart technique according to manufacturer specifications (Clontech, Palo Alto, CA). Amplification was carried out in a MJ Research PTC 100 thermocycler with 5 min of initial denaturation at 94°C, then 94°C for 30 sec, 69°C for 40 sec, than 9 cycles at 72°C for 40 sec increment – 0.5°C per cycle, than 94°C for 30 sec, 64°C for 40 sec, and 40 sec at 72°C during 24 times of extension, followed by a final extension at 72°C for 5 min. Amplicons generated were analyzed by electrophoresis, and visualized by ethidium bromide staining followed by UV exposure. DNA was purified using isopropanol precipitation when necessary.

RESULTS

In our sample, we identified three different lengths of polythymidine tract. Figure 1 shows results of allele-specific PCR for detection of CFTR intron 8 variable length polythymidine tract. Individuals were characterized at this locus with three distinct amplification reactions, labeled A, B, and C (corresponding to 5T, 7T or 9T alleles, respectively). Amplicons for 5T, 7T, and 9T alleles are 136, 138 and 140 bp long, respectively. For example, amplification accurately detects the presence of both 5T and 7T alleles in the appropriate lanes for a 5T/7T heterozygote. No 9T-derived amplification product is seen in the reaction specific for that allele in this individual. Other genotypes were similarly established. We used some controls that the genotype was established using DNA sequencing method.

Table I displays the polyT genotypes found according to CFTR mutations. Frequencies of 5T, 7T, and 9T alleles are shown on table II.

The 5T allele was seen in two male patients, who were previously tested for eleven different mutations (R334W, R347P, R347H, Q359K, Δ F508, S549N, G542X, G551D, R553X, W1282X, N1303K) (Streit *et al*, 2003) and we were not able to define their genotype. If the 5T allele is associated with the CBAVD phenotype, it may also be a factor underlying other atypically mild manifestations of CF and, perhaps, sinopulmonary disease of an unknown nature (Friedman *et al*, 1997).

DISCUSSION

Up to date, several studies are being carried out on CF patients, which evaluate clinical manifestations, mutations, genotype-phenotype correlation, incidence of the disease, prognostic aspects and survival. Studies aiming the molecular characterization of mutations associated with CF patients from different regions of Brazil were carried out by different groups (Raskin et al, 1997; Raskin et al, 1999; Cabello et al, 1999; Bernardino et al, 2000; Streit et al, 2003). However, there is no previous study looking at polyT tract in the Brazilian CF population.

The frequency of 5T allele was previously established to be approximately 5% in the Caucasian population in general. Therefore, it is expect to find one individual 5T/5T homozygous in every 400 people (Friedman et al, 1997). In our sample, no individuals were detected carrying the 5T/5T genotype. We would probably find more alleles with the 5T tract in a sample composed by infertile males due to CBAVD.

A similar study, carried out in a population of non-CF Caucasian chromosomes, was able to determine frequencies of polyT tract to be 4% for 5T, 83% for 7T and 13% for 9T (n=72) (Friedman et al, 1997). Frequencies established in our sample is similar to those published previously.

The prevalence of the 5T allele was reported to be four times higher (6 for 32 alleles) in a group of patients with diffuse bronchiectasis compared to the general population frequency (Pignatti et al, 1995). Previous studies reported that 19 out of 40 CBAVD men exhibited some symptoms of non-CF respiratory disease (rhinitis, sinusitis, or nasal

polyps) (Chillón et al, 1995). Sinusitis was observed in 4 out of 12 CBAVD men heterozygous for 5T alleles (Dumur et al, 1996). Just as mild CF symptoms early in life typically worsen age, the 5T allele may not pose a significant health burden beyond male infertility until later in life (Friedman et al, 1997). Each manifestation of CF is associated with a reduction of CFTR levels below a tissue-specific threshold value: 10 percent of normal levels in the case of vas deferens abnormalities, 5 percent in the case of lung and sweat-gland abnormalities, and 1 percent in the case of abnormalities of the exocrine pancreas (Cohn et al, 1998). A high frequency of 5T allele was also proved to be associated with CBAVD in Italian CF patients (Leonardi et al, 2003).

The 5T allele was also associated to R117H and R117C mutations. A study was carried out in the Australasian population and proved this association in patients with an elevated sweat chloride and clinical cystic fibrosis (Massie et al, 2001). In our sample, no individuals were identified to carry any of those mutations (R117H or R117C), so we were not able to evaluate this issue in this study.

Association of polymorphism of the polyT tract in intron 8 of the CFTR gene with chronic pancreatitis was confirmed in Japanese patients (Kimura et al, 2000).

The length of polyT tract is associated with levels of the mRNA transcribed. Variable levels of aberrantly CFTR transcripts were suggested to correlate with variable CF severity. Thus, over expression of alternative splicing factors can modulate the splicing pattern of CFTR alleles carrying splicing mutations. These results are important for understanding the

mechanism underlying phenotypic variability in CF (Nissim-Rafinia et al, 2000).

Our study permitted to determine frequencies of the intron 8 polythymidine tract in a Brazilian CF sample. These frequencies are similar to a previous study in a different sample with similar characteristics (CF patients with no further selection for any particular respiratory clinical manifestation and/or CBVAD). Correlation of polyT genotype to mutation genotype is not clear due to the fact that the majority of samples do not have their mutation genotype fully established yet. Therefore, it remains to be established if there is an correlation of a polyT genotype with a particular mutation genotype in these CF patients included in this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Associação Gaúcha de Assistência à Mucoviscidose (AGAM), parents and patients who allowed this study, and to the Pneumology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

This research was supported by different Brazilian Funding Agencies (CNPq, FAPERGS, PRONEX, and FINEP-HCPA). CS was recipient of a post-graduation scholarship by CNPq.

ELECTRONIC-DATABASE INFORMATION

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/> - CFGAC Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium.

REFERENCES

Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, Damaceno N, Zatz M. 2000. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test*, 4(1): 69-74.

Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena JJr, Greg J, Grody WW, Degraive WM, Fernandes O, Cabello PH. 1999. Cystic fibrosis: low frequency of deltaF 508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol*, 71(2): 189-196.

Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. 1995. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*, 332(22): 1475-1480.

Cohn AJ, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. 1998. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *New Eng J Med*, 10: 653-658.

Chou CS, Trapnell BC, Curristin SM, Cutting GR, Crystal RG. 1993. Genetic basis of variable exon 9 skipping in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator mRNA. *Nat Genet* 3: 151-156.

Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Delomel-Vinner E, Decaestecker B, Lafitte JJ, Roussel P. 1996. Congenital bilateral absence of the vas

deferens (CBAVD) na cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype. *Hum Genet*, 97(1): 7-10.

Friedman KJ, Heim RA, Knowles MR, Silverman LM. 1997. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene: association of the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum Mut*, 10: 108-115.

Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JÁ, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, Buchwald M, Tsui L-C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.

Kiesewetter S, Macek Jr M, Davis C, Curristin SM, Chou C-S, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui L-C, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR. 1993. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 5: 274-278.

Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Yutsudo Y, Kasuga M. 2000. Polymorphism of cystic fibrosis in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 45(10): 2007-2012.

Leonardi S, Bombace V, Rotolo N, Sciuto C, La Rosa M. 2003. Congenital absence of vas deferens and cystic fibrosis. *Minerva Pediatr* 55(1): 43-50.

Massie RJ, Poplawski N, Wilcken B, Goldblatt J, Byrnes C, Robertson C. 2001. Intron-8 polythymidine sequence in Australasian individuals with CF mutations R117H and R117C. *Eur Respir J* 17(6): 1195-1200.

-
- Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- Nissim-Rafinia M, Chiba-Falek O, Sharon G, Boss A, Kerem B. 2000. Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations. *Hum Mol Genet*, 9(12): 1771-1778.
- Patrizio P and Zielensky J. 1996. Congenital absence of the vas deferens: a mild form of cystic fibrosis. *Mol Med Today*: 25-31.
- Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M. 1995. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adult with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet*, 4(4): 635-639.
- Raskin S, Phillips III J. A, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Pilotto RF. 1993. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 46: 665-669.
- Raskin S, Philips IIIJA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Dawson E, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Culpi L. 1997. Regional distribution of cystic fibrosis – linked DNA haplotypes in Brazil: multicenter study. *Hum Biol* 69: 75-88.
- Raskin S, Philips III, Kaplan G, McClure M, Vnencak-Jones C, Rozov T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Pereira L, Faucz F, Gabardo J, Culpi L. 1999. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. *Hum Biol* 71: 103-113.

-
- Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Goshen R, Bentur L, Kerem BS. 1995. Levels of CFTR exon 9 skipping correlate with the severity of lung disease. *Ped Pulmonol* 12 (Suppl): 203.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
- Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R, Pereira MLS. 2003. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Metab*, 78(4): 259-264.
- Welsh MJ, Ranzey BW, Accurso F, Cutting GR. 2001. Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. New York, McGraw-Hill, pp. 5121-5173.
- Zielensky J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B-S, Grzelczak Z, Riordan J, Rommens J, Tsui L-C. 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10: 214-228.

LEGENDS

Figure 1: Identification of intron 8 polythymidine tract. Allele-specific PCR amplification was used to identify polymorphism at intron 8 of CFTR gene. M: indicates 100 bp ladder. Lanes A: indicate reaction for identification of 5T allele; lanes B: indicate reaction for identification of 7T allele; lanes C: indicate reaction for 9T allele. Sample 1 is a homozygous for 7T allele; sample 2 is a heterozygote for 5T/7T alleles; sample 3 is a negative control for the PCR reaction; sample 4 is a heterozygote for 7T/9T alleles.

Table I: PolyT and mutation genotypes in the CFTR gene found in 54 CF patients.

Table II: Frequencies of the 5T, 7T, and 9T alleles.

Figure 1

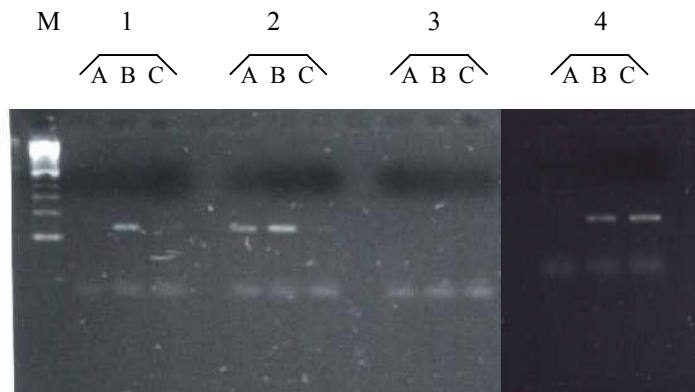


Table I

PolyT Genotype	CF Genotype	Number of patients
7T/9T	$\Delta F508/?$	21
	$?/? *$	10
	G542X/?	3
	$\Delta F508/G542X$	2
	$\Delta F508/R553X$	1
	$\Delta F508/R1162X$	1
	R334W/?	1
7T/7T	$?/? *$	10
	$\Delta F508/R334W$	1
	$\Delta F508/?$	1
9T/9T	$\Delta F508/?$	1
5T/7T	$?/? *$	2
TOTAL		54

* These patients were investigated due to characteristic CF clinical manifestations.

Table II

Allele	#	Frequency (%)
5T	2	1.85
7T	65	60.18
9T	41	37.96
Total	108	100

Parte 5

DISCUSSÃO

	<i>Pg.</i>
5.1- INTRODUÇÃO	62
5.2- ANÁLISE DA AMOSTRA	62
5.3- A HETEROGENEIDADE POPULACIONAL BRASILEIRA	62
5.4- IDADE DE DIAGNÓSTICO DE FC NO RS	63
5.5- FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES	64
5.6- CORRELAÇÃO GENÓTIPO/FENÓTIPO	67
5.7- FATORES EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DE FC	68
5.8- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FC	71
5.9- LIMITAÇÕES DO PROTOCOLO UTILIZADO	71
5.10- CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
5.11- PERSPECTIVAS FUTURAS	74

5.1- INTRODUÇÃO

A FC, por ser uma doença multissistêmica com ampla variedade de sintomas clínicos e elevada complexidade fenotípica, representa um desafio para a equipe médica. Este quadro ainda é mais grave para países em desenvolvimento, nos quais os recursos para diagnóstico e tratamento desta patologia são limitados.

Um caso especial a ser relatado é o Brasil, pois este é um país com grande contingente caucasóide e altas taxas de miscigenação racial, onde esperava-se que a doença fosse bastante conhecida, pesquisada e relatada. Ao contrário, poucos são os casos diagnosticados e a doença permanece pouco conhecida em nosso meio (Raskin e Faucz, 2001).

5.2- ANÁLISE DA AMOSTRA

Na população avaliada, apenas 1 paciente era negróide (2,0%), todos os demais 49 (98,0%) eram caucasóides. Estes dados são estatisticamente significativos, concordando com os dados descritos na literatura sobre a maior frequência da doença em grupos predominantemente caucasóides.

Nesta amostra, 10 em 50 pacientes possuíam história conhecida de FC na família. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da existência de outros casos ou até mesmo de óbitos que não tenham sido atribuídos à doença, pois o diagnóstico dessa condição ainda hoje apresenta inúmeras limitações.

Além disso, conforme esperado para uma doença autossômica recessiva, não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo dos pacientes ($p > 0,05$).

5.3- A HETEROGENEIDADE POPULACIONAL BRASILEIRA

A população brasileira é constituída por aproximadamente 54% de caucasóides de origem européia e 46% de mestiços incluindo negros, ameríndios e asiáticos. A população caucasiana é constituída por descendentes de portugueses (30%), italianos (22%), espanhóis (10%), alemães (6%) e muitos outros (32%). Apesar da grande miscigenação étnica do Brasil, descendentes

européus desprovidos de miscigenações foram encontrados primeiramente nas regiões sul e sudeste (Raskin et al., 1997b; Raskin et al., 1999).

Apesar da heterogeneidade étnica existente na população brasileira, existem alguns grupos que podem estar mais associados à doença no nosso estado. Na amostra estudada, 59,7% dos pacientes disseram ter até a segunda geração de seus progenitores descendência italiana; 55,2%, alemã; 17,9%, portuguesa; 10,4%, polonesa; 9,0%, espanhola; 4,5%, indígena e 4,5%, negróides. Tal fato culmina em um alto percentual de pacientes portadores de FC no Rio Grande do Sul quando comparado com o de outros estados. Apesar da grande variabilidade étnica, a amostra estudada foi estratificada basicamente em descendentes de italianos, alemães e portugueses, o que representa 54,54%. Já nos estados do Nordeste a contribuição de Portugueses prevalece, ao passo que sul do Brasil a imigração de Europeus originário de diferentes países foram responsáveis por uma diversidade étnica na região Sul. Este fato demonstra a significativa importância de realização de estudos locais sobre a FC.

A distribuição dos pacientes com FC e sua heterogeneidade no Brasil foi relacionada aos países do sul europeu (Raskin et al., 1997a). Os dados descritos na literatura concordam com os dados históricos do processo de colonização do Brasil, o qual está associado à presença de um número significativo de imigrantes provenientes da região sul da Europa.

5.4- IDADE DE DIAGNÓSTICO DE FC NO RIO GRANDE DO SUL

Na amostra estudada, composta por pacientes nascidos no Rio Grande do Sul, a grande maioria deles (41 dos 50) tinham entre 0 e 16 anos (82,0%) na época da coleta do material, em 1997, e apenas 9 pacientes tinham mais de 16 anos (18,0%).

Neste estudo, mais da metade dos pacientes foram diagnosticados com até 1 ano de idade (mediana = 1,0). A média de idade de diagnóstico foi estabelecida em 2 anos e 5 meses. Este elevado índice de diagnóstico precoce não é o retrato fiel, infelizmente, da realidade do país. O estado do RS possui um centro de referência nacional para pacientes com FC no Hospital de

Clínicas de Porto Alegre, o que faz com que as taxas de diagnóstico sejam otimizadas em relação a outros estados do país, pois a grande maioria dos pacientes (74,0%) foi diagnosticada nos primeiros anos de vida, em idades variáveis entre 0 e 36 meses. Por outro lado, em um estudo previamente realizado no estado do Espírito Santo, a média de idade de diagnóstico de pacientes com FC foi estabelecida em 1,8 anos. Esta é uma idade significativamente precoce quando comparada à de outros estados do Brasil. Tal fato tem importante implicação clínica para um tratamento adequado e precoce, o qual se mostra ser significativo para uma melhora na qualidade e da expectativa de vida (Rabbi-Bortolini et al., 1998).

A idade do diagnóstico tem um importante valor, pois está diretamente associada ao risco de morte dos pacientes com FC. O aumento do risco de morte em crianças cujo diagnóstico foi feito com mais de 12 meses de idade indica que estas crianças deveriam receber tratamento diferenciado e intensivo de uma equipe multidisciplinar especializada (Camargos *et al.*, 2000).

5.5- FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES

Neste estudo foi possível estimar a frequência das mutações mais comuns, em nosso meio. O genótipo dos pacientes analisados foi relacionado às manifestações clínicas dos mesmos estabelecendo uma correlação entre a presença e a combinação das mutações e o grau de comprometimento dos pacientes portadores de FC.

A frequência das mutações $\Delta F508$, G542X, G551D, R553X e N1303K, assim como a prevalência das mesmas na nossa população pode ser observada em estudo previamente realizado neste estado (Streit et al., 1999; Raskin et al., 1999).

Os pacientes cujos genótipos não foram estabelecidos pela análise anterior foram submetidos à análise por SSCP (tabela 5.1). O protocolo possibilitou a identificação de 15 pacientes (30,0%) com alterações nos 9 exons. Somando-se a análise de 4 exons realizada em estudo prévio (Streit et al., 1999) com a de 9 exons realizada no presente estudo, foram rastreados 44,4% do gene da FC na amostra estudada.

Tabela 5.1: Número de pacientes identificados com alterações pela técnica de SSCP em seus respectivos exons.

Exon	Número de amostras alteradas
3	0
4	0
5	0
7	7
11	3
12	0
19	2
20	3
22	0
	15

Os pacientes que apresentaram alterações, pela técnica de SSCP nos exons estudados, foram submetidos a análise para detecção de mutações específicas nos seus respectivos exons (tabela 5.2). Com base nesta análise, foram identificados o genótipo de 3 pacientes dos 50, perfazendo um total de 6% (tabela 6.3). Através de triagem de DNA, com o uso das técnicas empregadas (em estudo prévio associadas a este estudo) foi possível a identificação de 85 dos 154 alelos mutantes para FC, ou seja, foram identificadas mutações em 55,2% dos alelos analisados. Entretanto, não foi possível neste estudo determinar o genótipo de todos os pacientes analisados. Tal fato pode ser observado na tabela 5.3.

As mutações R347P, R347H, Q359K e S549N não foram encontradas nesta amostra. Já as mutações R1162X e W1282X foram encontradas em uma frequência de 1,0% cada uma, ou seja, 1 alelo alterado para cada mutação citada.

Em torno de 48% dos pacientes são heterozigotos compostos possuindo 1 alelo desconhecido (não identificado pelo presente estudo). Já 46% dos mesmos possuem ambos alelos desconhecidos até o presente momento.

A amostra estudada foi dividida de acordo com os diferentes grupos étnicos aos quais pertenciam até a segunda geração de progenitores. Para a análise estatística mais precisa, a amostra foi avaliada levando-se em consideração apenas 3 grupos étnicos predominantes: italianos, alemães e

Tabela 5.2: **Tabela das mutações específicas pesquisadas.**

Exon	Mutação	Nº de alelos	Frequência (%)
7	R334W	1	1
	R347P	0	0
	R347H	0	0
	Q359K	0	0
11	S549N	0	0
19	R1162X	1	1
20	W1282X	1	1
?	?	70	70
Total		100	100

Tabela 5.3: **Genótipo dos pacientes analisados.**

Genótipo	Nº de pacientes	Porcentagem (%)
Δ F508/?	21	42
Δ F508/R334W	1	2
Δ F508/R1162X	1	2
Δ F508/W1282X	1	2
G542X/?	3	6
?/?	23	46
Total	50	100

portugueses. Foram então correlacionadas as diferentes origens étnicas com as frequências das mutações estudadas. A frequência das mutações foi testada entre os 3 grupos. Para todas as mutações avaliadas não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

No entanto, pode-se dizer que nenhuma das mutações é mais frequente em um determinado grupo étnico. Contudo, uma das possíveis explicações para tal fato é o tamanho reduzido da amostra.

As mutações R347P, Q359K e S549N não foram encontradas no presente estudo. Por outro lado, 1 alelo foi detectado portador da mutação R1162X em um paciente de origem italiana. Além disso, foi encontrado 1 alelo portador da mutação R334W em um paciente que tinha ascendência espanhola e italiana. Já a mutação W1282X foi encontrada em 1 alelo de um paciente que tinha ascendência italiana e alemã.

As frequências das mutações encontradas no presente estudo foram comparadas com as frequências mundiais. Para as mutações R334W, R347P,

S549N, R1162X e W1282X não existe diferença estatisticamente significativa ($p = 0,117$; $p = 1,0$; $p = 1,0$; $p = 0,263$; e $p = 0,216$, respectivamente).

No entanto, a análise estatística pelo método de Qui-quadrado por aderência possibilitou afirmar que existe diferença significativa entre o total das mutações identificadas no presente estudo e o total de mutações identificadas no estado do Rio Grande do Sul no estudo realizado por Raskin e colaboradores (1999) ($p < 0,01$).

5.6- CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

A variabilidade desta patologia hereditária pode ser atribuída a três fatores: a natureza do defeito no gene responsável, o contexto em que o gene opera e a influência do desenvolvimento. Existe uma correlação entre o genótipo e a gravidade da doença do órgão ou sistema afetado. Uma associação próxima foi descrita entre o genótipo CFTR e o estado pancreático do paciente. Uma clara, porém menos significativa, correlação existe entre as mutações e o grau de alterações de cloreto no suor assim como a presença de íleo-meconial. O genótipo CFTR tem alguma influência sobre a doença pulmonar. Além disso, anormalidades do desenvolvimento do aparelho reprodutivo masculino parecem estar associadas com a natureza das mutações no gene CFTR. No entanto, deve-se considerar que diferentes tecidos epiteliais requerem diferentes níveis de CFTR normal e funcional, como por exemplo o pâncreas tem o mais baixo índice de requerimento de CFTR seguido pelas glândulas sudoríparas, pulmão e os vasos deferentes que possui o mais alto índice (Welsh et al, 2001).

Os pacientes homocigotos para a mutação $\Delta F508$ apresentam grande comprometimento do pulmão, pâncreas, aparelho gastrointestinal e dificuldade em ganhar peso. Conforme esperado, os pacientes portadores da mutação $\Delta F508$ manifestam a doença mais precocemente que os outros.

No entanto, a natureza multifuncional da proteína CFTR e a presença de variáveis genéticas sugerem uma interpretação simplista de associações genótipo/fenótipo em FC. Essas associações podem ser úteis para testar hipóteses ou para estabelecer parâmetros comparativos entre os diferentes

grupos de pacientes, mas são de pouco valor para os pacientes quando considerados individualmente.

Na amostra estudada, pode ser constatado um grande número de pacientes com infecções nas vias aéreas por diferentes bactérias. Além disso, as manifestações gastrointestinais estão presentes em quase todos os pacientes independentemente do genótipo identificado. Por outro lado, a presença de íleo meconial e de diabetes mellitus podem ser relacionadas à presença de pelo menos um alelo mutante para $\Delta F508$.

Pela análise de variância de um fator (ANOVA) na amostra estudada, o genótipo dos pacientes não influenciou no tempo de vida dos pacientes, o que indica que os diferentes genótipos não são responsáveis pela longevidade quando considerados isoladamente, pois existem vários outros fatores interagindo na qualidade de vida do paciente. Para uma melhor correlação é necessária a análise com um maior número de indivíduos constituintes da amostra em estudo.

Conforme esperado para uma doença genética autossômica recessiva, não existe diferença significativa da presença de um dos sexos em relação ao outro entre os pacientes que compõem a amostra. Além disso, não houve diferença entre a média de idade dos pacientes quando se compara os dois sexos, ou seja, o sexo não influencia na longevidade nem no perfil clínico dos pacientes. Isto pode ser avaliado através de métodos estatísticos baseados na análise pela variância de um fator e Qui-quadrado por independência.

5.7- FATORES EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA FISIOPATOLOGIA DE FC

As manifestações clínicas de FC envolvem muitos fatores. Em 1988, Anyane-Yeboah e Heggarty discutiram as discordâncias de expressão das mutações e os sinais indicativos de FC. Tais pesquisadores sugeriram a existência de outros fatores além das mutações no gene da FC que levariam as alterações fenotípicas de FC. Entre estes fatores pode-se citar genes modificadores, como os genes produtores de mucinas, polimorfismos genéticos, conformação da cromatina além dos fatores ambientais.

A cromatina é uma estrutura altamente organizada e densamente compacta, que não permite o acesso fácil das RNA-polimerases e, por isso, os fatores de transcrição são necessários para ajudar na sua ativação, originando uma estrutura aberta que possibilitará a ocorrência de transcrição. Sinais ambientais, tais como as concentrações extra-celulares de certos íons e pequenas moléculas nutrientes, temperatura, choque, etc., podem resultar na alteração dramática do padrão da expressão gênica.

As restrições estruturais, que são adicionais às impostas pela estrutura primária do DNA, contribuem para a estrutura secundária da molécula. As pontes de hidrogênio intermoleculares também permitem a formação de cópias de DNA-RNA e de RNA fita dupla. Dessa maneira, podem formar-se pontes de hidrogênio entre as bases de uma mesma molécula de DNA ou de RNA. Sendo assim, as seqüências que apresentam repetições próximas, complementares e invertidas estão propensas a formar estruturas em grampo ou em alça e são estabilizadoras das pontes de hidrogênio entre as bases complementares podendo culminar em uma alteração da expressão do produto proteico.

Além da conformação, a metilação do DNA é um mecanismo que exerce um papel importante na transcrição, pois promove a manutenção da repressão da mesma. As diferentes formas de comunicação e sinalização celular também são passíveis de alteração, culminando em uma variação da expressão gênica. A transcrição de um único gene pode ser iniciada a partir de uma variedade de promotores alternativos e pode resultar em diferentes isoformas com diferentes propriedades tecido-específicas. Além disso, o controle da tradução da expressão gênica pode envolver o reconhecimento específico de seqüências reguladoras por proteínas de ligação a RNA, em seqüências não traduzidas do mRNA. Logo, fica evidente uma grande variedade de mecanismos empregados em nível de processamento do RNA, com alelos únicos em um indivíduo freqüentemente sendo capazes de gerar uma diversidade de produtos gênicos (isoformas).

Além dos fatores intrínsecos citados acima, fatores ambientais podem exercer uma influência significativa nas manifestações fenotípicas como, por exemplo, a situação sócio-econômica, o cuidado e envolvimento familiar, o

desenvolvimento biológico, etc, tornando árdua a tarefa de estabelecer uma associação genótipo/fenótipo.

Dentre os polimorfismos no gene CFTR pode-se citar os três possíveis alelos no intron 8 de variações de comprimento de politimidina (5T, 7T e 9T). No entanto, para determinar o comprimento foi necessário um alto nível de adstringência para aumentar a especificidade da técnica de PCR. Um número considerável de amostras falsos-positivos foi obtido devido a baixas temperaturas de anelamento. Para eliminar tal problema foi usado a enzima TaqStart[®], na qual está acoplado à enzima Taq DNA polimerase um anticorpo monoclonal.

A frequência do alelo 5T foi previamente estabelecida em, aproximadamente, 5% da população caucasiana, e a frequência de indivíduos homocigotos para 5T/5T foi estabelecida em 1 caso em cada 400 pessoas (Friedman et al, 1997). Todavia, na nossa amostra nenhum indivíduo com o genótipo homocigoto para o alelo 5T foi detectado. Este genótipo foi associado com ACVD e problemas gastrointestinais.

Estudos prévios registraram que 19 em 40 homens com ACVD exibiram alguns sintomas de doenças respiratórias (rinite, sinusite ou pólipos nasais) (Casals et al, 1995; Chillón et al. 1995). Sinusite foi observada em 4 dos 12 homens com ACVD heterocigotos para os alelos 5T (Dummur et al, 1996).

A variabilidade no intron 8 associado às mutações em FC podem estar associadas causando diversas formas de manifestação da doença. Pacientes portadores da mutação R117H e do alelo 5T geralmente desenvolvem doença pulmonar. Já os pacientes R117H e 7T demonstram função pulmonar normal, embora os pacientes apresentem anormalidades dos vasos deferentes. Os alelos R117H/5T e R117H/7T são associados com SP, indicando que a função pulmonar é influenciada pela natureza do defeito no CFTR (Welsh et al, 2001).

Na nossa amostra (composta por 54 pacientes), a variabilidade da expressão da doença foi considerável e sua relação com mutações específicas associadas com FC apresentou-se muito complexa. Tal evidência torna clara a necessidade de estudos complementares com um maior número de pacientes para delinear com mais eficiência a correlação genótipo/fenótipo (tabela 5.4).

A presença do alelo 5T foi identificada em 2 pacientes porém, infelizmente, os genótipos não foram identificados apesar de terem sido rastreados para 44,4% da região codificante do gene CFTR pela técnica de SSCP. E, terem sido testados para as 11 mutações no gene da FC (R334W, R347P, R347H, Q359K, Δ F508, S549N, G542X, G551D, R553X, W1282X, N1303K). A tabela 6.5 mostra o genótipo e os respectivos polimorfismos nos 54 pacientes analisados no presente estudo (pacientes heterozigotos para a mutação Δ F508 ou não portadores da mesma).

O alelo 5T foi encontrado em dois indivíduos heterozigotos compostos (1,85%), já o polimorfismo 7T, o mais comum, foi detectado em 65 alelos (60,18%) enquanto o alelo 9T estava presente em 41 alelos. As frequências dos alelos foram estabelecidas em 1,85%, 60,18% e 37,96%, respectivamente.

5.8- DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE FC

O diagnóstico molecular de FC pode ser muito útil para identificar precocemente pacientes e assim, dar início ao tratamento o mais rápido possível. Isto tem se mostrado significativo para uma melhora na qualidade de vida e, conseqüentemente, uma longevidade destes pacientes.

Este fato é uma realidade em países como o Brasil em que a maioria dos casos permanecem, provavelmente, sem diagnóstico e principalmente, pela existência de muitas famílias em situação sócio-econômica não privilegiada.

Além disso, o diagnóstico precoce tem suma importância para prevenção de muitas famílias “de risco”.

5.9- LIMITAÇÕES DO PROTOCOLO UTILIZADO

Com base na tabela 5.4 fica evidente a limitação do estabelecimento de uma correlação genótipo/fenótipo clara, uma vez que existem vários pacientes que ainda não apresentam a identificação completa das mutações. Isto deve-se ao fato que, no presente estudo, foram submetidas a triagem as regiões mais

Tabela 5.4 : **Genótipo do gene CFTR para os 54 pacientes.**

Poly T genótipo	Genótipo	Nº de pacientes
7T/9T	$\Delta F508/?$	21
	?/?	10
	G542X/?	3
	$\Delta F508/G542X$	2
	$\Delta F508/R553X$	1
	$\Delta F508/R1162X$	1
	R334W/?	1
7T/7T	?/?	10
	$\Delta F508/R334W$	1
	$\Delta F508/?$	1
9T/9T	$\Delta F508/?$	1
5T/7T	?/?	2
TOTAL		54

suscetíveis a mutações e detectadas apenas as alterações mais freqüentes no gene CFTR. Para uma análise mais abrangente, deve-se realizar um estudo complementar que vise a detecção de mutações nas demais regiões codificadoras do gene CFTR (55,6%), pois este estudo deteve-se a avaliação de 44,4% da mesma.

5.10- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a análise da região codificante do gene CFTR e detecção de mutações específicas foram avaliados 50 pacientes nascidos no estado do Rio Grande do Sul. Os achados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes considerações:

- O protocolo laboratorial utilizado neste estudo foi capaz de identificar as mutações específicas em 3 dos 100 alelos analisados, o que resulta em um percentual de 3,0%.
- Com a utilização deste protocolo, associado ao empregado em estudo anterior (Streit *et al.*, 1999), foi possível a triagem de mutações em 44,4% do gene da FC.
- A técnica de SSCP mostrou-se bastante efetiva e eficaz para rastreamento e identificação de pacientes portadores de FC.

- É possível que existam mutações ainda não descritas na amostra, pois estudos realizados em brasileiros são pouco frequentes e esta população apresenta um alto grau de miscigenação.
- A análise dos diferentes grupos étnicos é importante para um maior conhecimento da doença, pois pode ser estabelecida uma correlação entre as diferentes frequências das mutações e a etnia da população em populações de menor miscigenação.
- Os resultados obtidos sugerem que o fenótipo dos pacientes com FC estudados não resulta apenas do genótipo dos mesmos, confirmando achados publicados anteriormente.
- Conforme esperado para uma doença genética autossômica recessiva, não houve diferença significativa da presença de um dos sexos em relação ao outro entre os pacientes que compõem a amostra. Além disso, não houve diferença entre a média de idade dos pacientes quando se compara os dois sexos, ou seja, o sexo não influencia no tempo de vida nem no perfil clínico dos pacientes.

Para a análise do polimorfismo de politimidinas, foram avaliados 54 indivíduos portadores de FC, o que possibilitou as seguintes considerações finais:

- A presença do alelo 5T foi identificada em 2 pacientes cujos genótipos não foram identificados até o momento, apesar dessas análises.
- O alelo 5T, quando associado à mutação R117H, pode estar associado a uma condição clínica de azoospermia.
- Os 2 indivíduos portadores do alelo 5T foram testados para a detecção da mutação R117H por seqüenciamento direto de DNA não se revelando portadores da mesma. Estes dados concordam com os resultados obtidos pelo rastreamento de pacientes pela técnica de SSCP, pela qual não foi identificado nenhum paciente com alteração no exon 4 do gene CFTR. Adicionalmente, os 2 pacientes com azoospermia estudados não são portadores da mutação R117H.
- O genótipo mais comum estabelecido no presente estudo foi 7T/9T, o qual foi encontrado em 39 pacientes (72,2%), seguido do genótipo 7T/7T,

encontrado em 12 pacientes (22,2%) e do genótipo 5T/7T, encontrado em 2 pacientes (3,7%) e, finalmente, do genótipo 9T/9T, em 1 paciente (1,85%).

5.11- PERSPECTIVAS FUTURAS

No Rio Grande do Sul, esta pesquisa constitui uma importante ferramenta de identificação genotípica de indivíduos portadores de FC. A caracterização molecular da população deste estado, por exemplo, é um importante aspecto para os estudos da FC no Brasil, porém depende da análise de um maior número de mutações.

O presente estudo deve ser continuado por uma análise mais completa de toda a região codificadora do gene da FC, seguida de, por exemplo, seqüenciamento de nucleotídeos. A possível existência de mutações ainda não descritas foi considerada, principalmente porque estudos realizados em brasileiros são pouco freqüentes e esta população apresenta um alto grau de miscigenação.

Parte 6

CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

- ① A identificação de alterações nas seqüências de nucleotídios dos exons 3, 4, 5, 7, 12, 19, 20 e 22 do gene CFTR foi possível através da técnica de SSCP. Esta técnica foi perfeitamente viável de execução em nosso meio e permitiu a detecção de 7 pacientes com alterações no exon 7, 3 pacientes com alterações no exon 11, 2 pacientes com alterações no exon 19 e 3 pacientes com alterações no exon 20. Nenhum paciente apresentou alteração nos exons 3, 4, 5, 12 e 22.
- ② As freqüências das mutações R334W, R1162X e W1282X na amostra estudada foram estabelecidas em 1,0% para cada uma destas mutações. Não foram encontrados pacientes portadores das mutações R347P, R334H, Q359N e S549N na amostra estudada.
- ③ Dos 50 pacientes da amostra estudada, foram identificados os genótipos de 3 pacientes (6,0%).
- ④ Com a utilização deste protocolo, foi possível a identificação do polimorfismo de politimidinas na amostra estudada.
- ⑤ O alelo 5T foi encontrado em 2 dos 108 alelos analisados (1,85%). Os pacientes portadores desse alelo ainda não tem seus respectivos genótipos estabelecidos, apesar da análise realizada durante este estudo. O polimorfismo 7T, o mais comum, foi detectado em 65 alelos (60,18%) enquanto o 9T estava presente em 41 alelos (37,96%).
- ⑥ Os resultados obtidos sugerem que o fenótipo dos pacientes com FC estudados não resulta apenas do genótipo dos mesmos, confirmando achados publicados anteriormente.

Finalmente, estudos moleculares do gene da FC em pacientes com suspeita clínica são importantes não só para o diagnóstico mais precoce e preciso como para prever a gravidade do fenótipo (apesar das atuais limitações) e a realização de estudos familiares. Assim sendo, trabalhos como este são de fundamental importância para que as medidas de tratamento e prevenção disponíveis para esta doença tenham maior eficácia.

Parte 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS E INFORMAÇÕES ELETRÔNICAS

- Anderson, M.P.; Wesh, M.J. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science*, 254 (5077): 1701-1704, 1992.
- Anguiano, A; Oates, R.D.; Amos, J.A, Dean, M.; Gerrard, B., Stewart, C.; Maher, T.A; White, M.B.; Milunsky, A Congenital bilateral absence of the vas deferents: a primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA*, 267:1794-1797, 1992.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Deidmann, J.G.; Smith, J.A; Struhl, K. *In: Current protocol in molecular biology*. Cambridge, John Willey & Sons, 1997.
- Bal, J.; Sturman, M.; Schloesser, M.; Schmidtke, J.; Reiss, J. A cystic fibrosis patient homozygous for the nonsense mutation R553X. *J Med Genet*, 28: 715-717, 1991.
- Balnaves, M. E.; Bonacquisto, L.; Francis, I.; Glazner, J.; Forrest, S. The impact of newborn screening on cystic fibrosis testing in Victoria, Australia. *J Med Genet* 32: 537-542, 1995.
- Bernardino, A L.; Ferri, A; Passos-Bueno, M. R.; Kim, C. E.; Nakaie, C. M.; Gomes, C. E.; Damasceno, N.; Zatz, M. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test* 4: 69-74, 2000.
- Bienvenu, T.; Beldjord, C.; Djiman, M.; Kaplan, J.C. Male infertility as the only presenting sign of cystic fibrosis when homozygous for the mild mutation R117H. *J Med Genet*, 30:797, 1993.
- Bowling, F. G.; McGill, J. J.; Shepherd, R. W.; Danks, D. M. Screening of Cystic Fibrosis: use of D-F508 mutation. *Lancet*, 335: 925-926, 1990.
- Budowle, B.; Chakaborty, R.; Giusti, A M.; Eisenberg, A J.; Allen, R. C. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144, 1991.
- Cabello, G. M.; Moreira, A F.; Horovitz D.; Correia, P.; Santa Rosa, A; Llerena J. Jr.; Greg, J.; Grody, W. W.; Degrave, V. M.; Fernandes, O; Cabello, P. H.

- Cystic fibrosis: low frequency of the DF508 mutation in two population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol*, 71(2): 189-196, 1999.
- Cabello, G. M.; Cabello, P. H.; Jr, J. L.; Fernandes, O; Harris, A. The 3120+1G>A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol* 73 403-409, 2001.
- Camargos, P.A; Guimaraes, M. D.; Reis, F. J. Prognostics aspects of cystic fibrosis in Brazil. *Ann Trop Paediatr* 20(4): 287-291, 2000.
- Campos, J.V.M. Defeitos pré-entéricos da má absorção. In: *Gastroenterologia Clínica*, Dani R., Castro, L.P. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 725-732, 1993a.
- Campos, J.V.M. Intestino Delgado. Anatomia Funcional. In: *Gastroenterologia Clínica*, Dani R., Castro, L.P., 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 674-704, 1993b.
- Campos, J.V.M.; Kotze, L.M.S.; Damceno, N.; Carvalho, C.R.R. *Fibrose cística – Mucoviscidose*. São Paulo. IBEPEGE – Arquivos de gastroenterologia. 48 p., 1996.
- Casals, T.; Bassas, L.; Ruiz-Romero, J.; Chillón, M.; Giménez, J.; Ramos, M. D.; Tapia, G.; Narvaez, H.; Nunes, V.; Estivill, X. Extensive analysis 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens : In 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet*, 95:205, 1995.
- Castellani, C.; Bonizzato, A; Mastella, G. CFTR mutations and IVS8-5T variant in newborns with hypertrypsinaemia and normal sweat test. *J Med Genet*, 34: 297-301, 1997.
- Cheadle, J.; Al-Jader, L.; Goodchild, M.; Meredith, A L. Mild pulmonary disease in a cystic fibrosis child homozygous for the R553X. *J Med Genet*, 29: 597, 1992.
- Chillón, M.; Casals, T.; Mercier, B.; Bassas, L.; Lissens, W.; Silber, S.; Romey, M-C.; Ruiz-Romero, J.; Verlingue, C.; Claustres, M.; Nunes, V.; Fêrec, C.; Estivill, X. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *New Engl J Med*, 332: 1475, 1995.

- Chou, J-L.; Rozmahel, R.; Tsui, L-C. Characterization of the promoter region of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *J Biol Chem*, 36: 22471-22476, 1991.
- Chou, C. S.; Trapnell, B. C.; Curristin, S. M.; Cutting, G. R.; Crystal, R. G. Genetic basis of variable exon 9 skipping in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator mRNA. *Nat Genet* 3:151-156, 1993.
- Cohn, A J.; Friedman, K. J.; Noone, P. G.; Knowles, M. R.; Silverman, L. M.; Jowell, P. S. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *New Eng J of Med*, 10:653-658, 1998.
- Colledge, W. H. Cystic Fibrosis gene therapy. *Cur Opin in Genet and Devel*, 4: 466-471, 1994.
- Cuppens, H.; Marynen, P.; De Boeck, C.; Cassiman, J. J. Detection of 98,5% of the mutations in 200 Belgian cystic fibrosis alleles by reverse dot-blot and sequencing of the complete coding region and exon/intron junctions of the CFTR gene. *Genomics*, 18: 693-697, 1993.
- Curtis, A; Nelson, R.; Porteous, M.; Burn, J.; Bhattacharya, S. S. Association of less common cystic fibrosis mutations with a mild phenotype. *J Med Genet*, 28: 34-37, 1991.
- Cutting, G. R.; Kash, L. M.; Rosenstein, B. J.; Tsui, L.-C.; Kazazian, H. H. Jr.; Antonarakis, S. E. Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *New Eng J Med*, 323: 1685-1689, 1990a.
- Cutting, G. R.; Kash, L. M.; Rosenstein, B. J.; Zielenski, J.; Tsui, L.-C.; Antonarakis, S. E., Kazazian, H. H. Jr. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature*, 346: 366-369, 1990b.
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). *Hum Mut*, 4: 167-177, 1994.
- Delaney, S. J.; Alton, E. W. F. W.; Smith, S. N.; Lunn, D. P.; Farley, R.; Lovelock, P. K.; Thomsom, S. A; Hume, D. A; Lamb, D.; Porteous, D. J.;

- Dorin, J. R.; Wainwright, B. J. Cystic fibrosis mice carrying the missense mutation G551D replicate human genotype-phenotype correlations. *EMBO J*, 15: 955-963, 1996.
- De Miranda A B.; Llerena Junior, J.; Dallalana, L. T.; Moura-Neto, R. S.; Suffys, P. N.; Degrave, W. M. Use of PCR for the determination of the frequency of deltaF508 mutation in Brazilian cystic fibrosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88:309-312, 1993.
- Dumur, V.; Gervais, R.; Rigot, J.M.; Lafitte, J.J.; Manouvrier, S.; Bisete, J.; Mazeman, E.; Roussel, P. Abnormal distribution of the CF Δ F508 allele in azospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet*, 336(8713): 512, 1990.
- Dumur, V.; Gervais, R.; Rigot, J.M.; Delomel-Vinner, E.; Decaestecker, B.; Lafitte, J.J.; Roussel, P. Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) na cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype. *Hum Gen*, 97(1): 7-10, 1996.
- Eiberg, H.; Mohr, J.; Schmiegelow, K.; Nielsen, L.S.; Williamson, R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis syntenry. *Clin Genet*, 28:265-271, 1985.
- Estivill, X.; Shillon, M.; Casals, T. DF508 gene deletion in Cystic Fibrosis in southern Europe. *Lancet*, 1404, 1989a.
- Estivill, X.; Gasparini, P.; Novelli, G.; Casals, T.; Nunes, V.; Gallano, P.; Savoia, A; Ruzzo, A; Dalapiccola, B.; Pignatti, P.F. Linkage disequilibrium for DNA haplotypes near the cystic fibrosis locus in two south European populations. *Hum Genet*, 83: 175-178, 1989b.
- Estivill, X.; Bancells, C.; Ramos, C. Geographic distribution and regional origin of 264 cystic fibrosis mutations in European population. *Hum Mut*, 10(2): 135-154, 1997.
- Faraguna, D.; Giglio, L.; D'Orazio, C.; Pederzini, F.; Venderweis, U.; Mastella, G. Is clinical status at diagnosis a prognostic factor in CF infants identified by neonatal screening? *Ped Pulmon Supp*, 7: 46-51, 1991.

- Faucz, F. R.; Raskin, S.; Pereira, L.; Giménez, J. Ramos, M. D.; Casals, T.; Estivill, X. Detection of 80% of the cystic fibrosis mutations in a Brazilian population of Mediterranean ancestry. Submetido, 2000.
- Fernandes, O; Gutierrez, B.; Degrave, W.; Hyga, L.; Moraes, L.; Horovitz, D.; Almeida, J. C. C.; Llerena, Jr J. Determinação do genótipo de fibrocísticos numa amostra hospitalar do Rio de Janeiro. *Rev Bras Pat Clin*, 30(4): 159-163, 1994.
- Ferri, A Estudo de mutações do gene da fibrose cística em indivíduos normais e afetados da população brasileira. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, 1995.
- Friedman, K. J.; Heim, R. A; Knowles, M. R.; Silverman, L. M. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene: Association of the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum Mut*, 10: 108-115, 1997.
- Gaidzinski, D. Fibrose cística: estudo sobre o impacto de uma doença genética crônica no núcleo familiar. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.
- Gasparini, P.; Pignatti, P.F.; Novelli, G.; Dallapiccola, B.; Casals, T.; Nunes, V.; Estivill, X.; Fernandez, E.; Balassopoulou, A; Koukopoulos, D.; Sinova, L.; Komel, R. Mutation analysis in cystic fibrosis. *Engl J Med*, 323:62-63, 1990.
- Gasparini, P.; Novelli, G.; Estivill, X.; Olivieri, G.; Savoia, A; Ruzzo, A; Nunes, V.; Borgo, G.; Antonelli, M.; Williamson, R.; Pignatti, P.F.; Dallapiccola, B. The genotype of a linked DNA marker, MP6d-9, is related to the clinical course of cystic fibrosis. *J Med Genet*, 29:558-562, 1992.
- Gervais, R.; Dumur, V.; Rigot, J.M.; Lafitte, J.J.; Roussel, P.; Claustres, M.; Demaille, J. High frequency of R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. *New Eng J Med*, 328: 446-447, 1993.

- Gibson, L.E.; Cook, R.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of Pancreas utilizing Pilocarpine by iontoforesis. *Pediatrics*, 23: 545-549, 1959.
- Greg, R.G.; Wilfond, B.S.; Farrel, P.M.; Laxova, A; Hassemer, D.; Mischler, E.H. Application of DNA analysis in a population-screening program for neonatal diagnosis of cystic fibrosis (CF): comparison of screening protocols. *A J Hum Genet*, 52: 616-626, 1993.
- Guggino, S.E. Evolution of the delta F508 CFTR mutation. *Trends Micobiol*, 7(2): 55-58, 1999.
- Haliassos, A; Chomei, J. C.; Tesson, L.; Baudis, M.; Kruh, J.; Kaplan, J. C.; Kitzis, A Modification of enzymatically amplified DNA for detection of point mutations. *Nucleic Acids Res* 17:3606, 1989.
- Hamosh, A; Trapnell, B. C.; Zeitlin, P. L.; Montrose-rafizadeh, C.; Rosenstein, B. J.; Crystal, R. G.; Cutting. G. R. Severy deficiency of cystic fibrosis transmembrane condutance regulator messenger RNA carryng nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest*, 88: 1880-1885, 1991.
- Hamosh, A; King, T. M.; Rosenstein, B. J.; Corey, M.; Levison, H.; Durie, P.; Tsui, L.-C.; McIntosh, I.; Keston, M.; Brock, D. J. H.; Macek, M. Jr.; Zemkova, D.; Krasnicanova, H.; Vavrova, V.; Macek, M. Sr.; Golder, N.; Schwarz, M. J.; Super, M.; Watson, E. K.; Williams, C.; Bush, A; O'Mahoney, S. M.; Humphries, P.; DeArce, M. A; Reis, A; Burger, J.; Stuhmann, M.; Schmidtke, L.; Wulbrand, U.; Dork, T.; Tummler, B.; Cutting. G. R. Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation gly-to-asp at the codon 551 and the delta-F508 mutation are clinically indistinguishable from delta-F508 homozygotes, except for the decreased risk of meconium ileus. *Am J Genet*, 51: 245-250, 1992.
- Harris, A Cystic Fibrosis gene. *Brit Med Bulletin*, 48 (4): 738-753, 1992.
- Harris, A; Argent, B. E. The Cystic Fibrosis gene and its product CFTR. *Cell Biol*, 4: 37-44, 1993.
- Harris, A Cystic Fibrosis. *Q J Med*, 88: 229-232, 1995.

- Hoiby, N. Microbiology of Cystic Fibrosis. *In: Cystic Fibrosis*. Ed. By Hodson, M. E. & Geddes, M.M., Chapman & Hall Medical, pp. 75-78, 1995.
- Hyde, S. C.; Emsley, P.; Hartshron, M. J.; Mimmock, M. M.; Gileadi, U.; Pearce, S. R.; Gallagher, M. P.; Gill, D. R.; Hubbard, R. E.; Higgins, C. F. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346: 362-365, 1990.
- Kerem, B-S.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A; Markiewicz, D.; Cox TIC, Chakravati, A; Buchwald, M.; Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245: 1073-1080, 1989.
- Kerem, B-S.; Buchanan, J. A; Durie, P.; Corey, M.; Levison, H.; Rommens, J.; Buchwald, M.; Tsui L-C. DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Genet*, 44(6): 827-834, 1989.
- Kerem, E.; Corey, M.; Kerem, B.; Rommens, J.; Markiewicz, D.; Levison, H.; Tsui L-C.; Durie, P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis-analysis of the most common mutation (delta-F508). *New Eng J Med*, 323: 1517-1522, 1990a.
- Kerem, B-S.; Zielenski, J.; Markiewicz, D.; Bozon, D.; Gazit, E.; Yahav, J.; Kennedy, D.; Riordan, J. R.; Collins, F. S.; Rommens, J. M.; Tsui, L.-C. Identifications of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc Nat Acad Sci*, 87: 8447-8451, 1990b.
- Kiesewetter, S.; Macek Jr, M.; Davis, C.; Curristin, S. M.; Chou, C-S.; Graham, C.; Shrimpton, A E.; Cashman, S. M.; Tsui, L-C.; Mickle, J.; Amos, J.; Highsmith, W. E.; Shuber, A; Witt, D. R.; Crystal, R. G.; Cutting, G. R. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 5:274-278, 1993.
- Kimura, S.; Okabayashi, Y.; Inushima, K.; Yutsudo, Y.; Kasuga, M. Polymorphism of cystic fibrosis in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 45(10): 2007-2012, 2000.

- Kitzis A; Chomel, J.C.; Haliassos, A; Tesson, L.; Kaplan, J.C.; Feingold, J.; Giraud, G.; Lable, A; Dastugue, B.; Dumur V.; *et al.* Unusual segregation of cystic fibrosis alleles. *Nature*, 318: 380-382, 1995.
- Knowles, M.; Stutts, M.; Spock, A Abnormal ion permeation through Cystic Fibrosis respiratory epithelium. *Science*, 221: 1067-1070, 1983.
- Knowlton, R.G.; Cohen- Haguenaer, °; Cong, N.V.; Frézal, J.; Brown, V.A; Brarker, D.; Braman, J.C.; Schumm, J.W.; Tsui, L.C.; Buchwald, M.; Donniskeller, H. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis located on chromosome 7. *Nature*, 318: 380-382, 1995.
- Kosztolanyi, G.; Malik, N.; Rutishauser, M. Mild Cf in a delta F508? R347H compound heterozygote woman: does the manifestation of this genotype differ in the two sexes? *Clin Genet*, 49(2): 103-105, 1996.
- Kristidis, P.; Bozon, D.; Corey, M.; Markiewicz, D.; Rommens, J.; Tsui, L. C.; Durie, P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am. J. Genet*, 50: 1178-1184, 1992.
- LeGrys, V.A; Hood, R.E. Incidence and implications of false-negatives sweat test reports in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 4(3): 169-172, 1988.
- Leonardi, S.; Bombace, V.; Rotolo, N.; Sciuto, C.; La Rosa, M. Congenital absence of vas deferens and cystic fibrosis. *Minerva Pediatr*, 55(1): 43-50, 2003.
- Macri, N.C.; Gentile, S.A; Manterola, A; Tomezzoli, S.; Reis, C.F.; Garcia, L.I.; Fernandez, J.L.L. Epidemiology of cystic fibrosis in Latin America: Preliminary communication. *Ped Pul*, 10: 249-253, 1991.
- Maróstica, P. J.; Raskin, S.; Abreu, F.A. Analysis of the delta F508 mutation in Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res* 31: 529-532, 1998.
- Martins CS, Ribeiro F, Costa FF. Frequency of the cystic fibrosis delta F508 mutation in a population from São Paulo State. *Braz J Med Biol Res* 26: 1037-1040, 1993.

- Massie, R. J.; Poplawski, N.; Wilcken, B.; Goldblatt, J.; Byrnes, C.; Robertson, C. Intron-8 polythymidine sequence in Australasian individuals with CF mutations R117H and R117C. *Eur Respir J*, 17(6): 1195-1200, 2001.
- McIntosh, I.; Lorenzo, M.L.; Brock, D.J.H. Frequency of $\Delta F508$ mutation on cystic fibrosis chromosomes in UK. *Lancet*, 2(8676): 1404-1405, 1989.
- Miller, S. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215, 1988.
- Morrall, N.; Nunes, V.; Casals, T.; Chillon, M.; Gimenez, J.; Bertramptit, J.; Estivil, X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutations frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Gen*, 2: 1015-1022, 1993.
- Morrall, N.; Dörk, T.; Lievador, R.; Dziadek, V.; Mercier, B.; Férec, C.; Costes, B.; Girodon, E.; Zielensky, J.; Tsui, L.C.; Tummler, B.; Estivill, X. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Genet*, 8(2): 149-159, 1996.
- Moss, R. B. Cystic Fibrosis: Pathogenesis pulmonary infection and treatment. *Clin Infect Dis*, 21: 839-849, 1995.
- Newton, J.M.; Graham, A. *PCR*. 1st. Ed. United Kingdom, Bios Scientific Publishers Limited, p.161, 1994.
- Ng, I. S. L.; Pace, R.; Richard, M.; Kobayashi, K.; Kerem, B-T.; Tsui, L-C.; Beaudet, AL. Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum Genet*, 87: 613-617, 1991.
- Nissim-Rafinia, M.; Chiba-Falek, O; Sharon, G.; Boss, A; Kerem, B. Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations. *Hum Mol Genet*, 9(12): 1771-1778, 2000.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2766-70, 1989a.
- Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T.; Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879, 1989b.

- Osborne, L.; Santis, G.; Schwarz, M.; Klinger, K.; Dork, T.; McIntosh, I.; Schwartz, M.; Nunes, V.; Macek, M. Jr.; Reiss, J. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis gene (CFTR). *Hum Genet*, 89: 653-658, 1992.
- Patrizio, P.; Zielenski, J. Congenital absence of the vas deferens: a mild form of cystic fibrosis. *Mol Med Today*, 24-31, 1996.
- Parizotto, E.; Bertuzzo, C. S.; Ribeiro, A. F. Molecular characterization of cystic fibrosis patients in the State of São Paulo (Brazil). *J Hum Genet*, 34(10): 877, 1997.
- Pereira, L.; Raskin, S.; Freund, A. A.; Ribas, P.; Castro, R.; Pignatti, P.; Culpi, L. Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA→G in two southern Brazilian states. *Gen and Mol Biol* 22 (3): 291-294, 1999.
- Pier, G.B.; Grout, M.; Zaidi, T.; Maluleni, G.; Mueshenborn, S.S.; Banting, G.; Ratcliff, M.J.; Colledge, W.H. Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature*, 393(6680): 79-82, 1998.
- Pignatti, P. F.; Bombieri, C.; Marigo, C.; Benetazzo, M.; Luisetti, M. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adult with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet*, 4(4): 635-639, 1995.
- Porteous, D. J.; Dorin, R. D. Cloning the Cystic Fibrosis gene: implications for diagnosis and treatment. *Thorax*, 45: 46-55, 1990.
- Quinton, P. M. Chloride impermeability in Cystic Fibrosis. *Nature*, 301: 421-422, 1983.
- Rabbi -Bortolini, E.; Bernardino, A. L.; Lopes, A. L.; Ferri, A. S.; Passos-Bueno, M. R.; Zatz, M. Sweat electrolyte and cystic fibrosis mutation analysis allows early diagnosis in Brazilian children with clinical signs compatible with cystic fibrosis. *Am J Med Genet*, 76(4): 288-290, 1998.
- Raskin, S.; Phillips, III J. A.; Krishnamani, M. R. S.; Vnencak-Jones, C.; Parker, R. A.; Rozov, T.; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R.; Reis, F.; Rosario, N. A.; Ludwig, N.; Pilotto, R. F. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil

- by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet*, 46: 665-669, 1993.
- Raskin, S.; Philips III, J.A; Krishnamani, M. R. S.; Vnencak-Jones, C.; Parker, R. A; Dawson, E.; Rozov, T.; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R.; Reis, F.; Rosario, N. A; Ludwig, N.; Culpi, L. Regional distribution of cystic fibrosis – linked DNA haplotypes in Brazil: multicenter study. *Hum Biol*, 69: 75-88, 1997a.
- Raskin, S.; Philips III, J.A; Krishnamani, M. R. S.; Vnencak-Jones, C.; Parker, R. A; Rozov, T.; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R.; Reis, F.; Rosario, N. A; Ludwig, N.; Culpi, L. Cystic fibrosis in the brazilian population: DF508 mutation and *KM-19 / XV-2C* haplotype distribution. *Hum Biol*, 69: 499-508, 1997b.
- Raskin, S.; Philips III, Kaplan, G.; McClure, M.; Vnencak-Jones, C.; Rozov, T.; Cardieri, J. M.; Marostica, P.; Abreu, F.; Giugliani, R.; Reis, F.; Rosario, N. A; Ludwig, N.; Pereira, L.; Faucz F.; Gabardo, J.; Culpi, L. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. *Hum Biol*, 71: 103-113, 1999.
- Raskin, S.; Faucz F. Aspectos Genéticos da Fibrose Cística. In: Carakushansky, G. Doenças Genéticas em Pediatria. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 227-241, 2001.
- Rave-Harel, N.; Kerem, E.; Nissim-Rafinia, M.; Goshen, R.; Bentur, L.; Kerem, B. S. Levels of CFTR exon 9 skipping correlate with two severity of lung disease. *Ped Pulmonol* 12 (Suppl): 203, 1995.
- Reis, F.J.; Camargos, P.A; Rocha, S.F. Survival analysis for cystic fibrosis in Minas Gerais state, Brazil. *J Trop Pediatr*, 44(6): 329-331, 1998.
- Reiss, J.; Elelrmeyer, U.; Schollosser, M.; Fuhrmann, W.; Drews, D.; Posselt, H.G. Two cystic fibrosis patients with thw genotype G542X/G551D. *Hum Gen*, 91: 78-79, 1993.
- Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B-S.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J-L.; Drumm, M. L.; Iannuzzi, M. C.; Collins, F. S.; Tsui, L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning

- and characterization of the complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073, 1989.
- Rios, J.; Orellana, O; Aspillaga, M.; Avendano, I.; Largo, I.; Riveros, N. CFTR mutations in Chilean cystic fibrosis patients. *Hum Genet* 94: 291-294, 1994.
- Robbi-Bortolini, E.; Bernardino, A L.; Lopes, A L.; Ferri, A S.; Passos-Bueno, M. R.; Zatz, M. Sweat electrolyte and cystic fibrosis mutation analysis allows early diagnosis in Brazilian children with clinical signs compatible with cystic fibrosis. *Am J Med Genet*, 76(4): 288-290, 1998.
- Robbins, S. L. Fibrose Cística (FC, Mucoviscidose). In: *Patologia Estrutural e Funcional*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 439-441, 1991.
- Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B-S.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J. L.; Kennedy, D.; Hidaka, N.; Zsiga, M.; Buchwald, M.; Riordan, J. R.; Tsui, L-C.; Collins, F. S. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245: 1059-1065, 1989.
- Russo, M. P.; Romeo, G.; Devoto, M.; Barbujani, G.; Cabrini, G.; Giunta, A; D'Alcamo, E.; Leoni, G.; Sangiuolo, F.; Magnani, C.; Cremonesi, L.; Ferrari, M. Analysis of linkage disequilibrium between different cystic fibrosis mutations and three intragenic microsatellites in the Italian population. *Hum Mutat*, 5: 23-27, 1995.
- Salzano, F. M.; Freire-Maia, N. Populações Brasileiras: Aspectos Demográficos, Genéticos e Antropológicos. Companhia Editora Nacional, São Paulo, SP, 1967.
- Shackleton, S. Analysis of mutations in the CFTR gene. *Tese de doutorado*, University of Oxford, pp.204, 1996.
- Shrimpton, A E.; McIntish, I.; Brock, D. J. H. The incidence of the different cystic fibrosis mutations in the Scottish population: effects on prenatal diagnosis and genetic counseling. *J Med Genet* 28: 317-322, 1991.
- Soshani, T.; Augarten, A; Gazit, E.; Bashan, N.; Yahav, Y.; Rivlin, Y.; Tal, A; Seret, H.; Yaar, L.; Kerem, E.; Kerem, B-S. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish Cystic

- Fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet* 50:222-228, 1992.
- Streit, C. Análise de mutações em pacientes com fibrose cística nascidos no sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Ciências biológicas - Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1999.
- Streit, C; Burlamaque-Neto, AC.; Abreu e Silva, F.; Giugliani, R.; Pereira, M.L.S. *CFTR* Gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Met*, 78 (4): 259-264, 2003.
- Strong, T.V.; Smith, L.S.; Turpin, S.V.; Cole, J.L.; Hon, C.T.; Markiewicz, D.; Petty, T.L.; Craig, M.W.; Rosenow, E.C.; Tsui, S.C.; Iannuzzi, M.C.; Knowles, M.R.; Collins, F.S. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Eng J Med*, 325: 1630-1634, 1991.
- Thompson, E.A; Neel, J.V. Allelic disequilibrium and allele frequency distribution as a function of social and demographic history. *Am J Hum Genet*, 60(1): 197-204, 1997.
- Tsui, L.C. Mutation and sequence variations detected in the cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) gene: a report from the Cystic Fibrosis Analysis Consortium. *Hum Mut*, 1:197-203, 1992.
- Tucker, S.; Tannahill, D.; Higgins, C. Identification and developmental expression of the *Xenopus laevis* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mol Genet*, 1:77-82, 1992.
- Valle, D.; Sly, W. S. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edn. New York, McGraw-Hill, pp. 5121-5173.
- Wainwright, B. J.; Scambler, P. J.; Schmidtke, J.; Watson, E. A; Law, H.-Y.; Farrall, M.; Cooke, H.J.; Eiberg, H.; Williamson, R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*, 318: 384-385, 1985.
- Weaver, L. T.; Green, M. R.; Nicholson, K.; Mills, J.; Heeley, M. E.; Kuzemko, J. Á; Austin, S.; Gregory, G. A; Dux, A E.; Davis, J. Á. Prognosis in cystic fibrosis

- treated with continuous fluoxacillin from the neonatal period. *Arch Dis Child* 70: 84-90, 1994.
- Welsh, M.; Smith, A E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73: 1251-1254, 1993.
- Welsh, M.J. The path of discovery in understanding the biology of cystic fibrosis and approaches to therapy. *Am J Gastroenterol*, 89: 97-105, 1994.
- Welsh, M. J.; Tsui, L-C.; Boat, T. F.; Beaudet, A L. Cystic Fibrosis. *In*: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6th edn. New York, McGraw-Hill, pp. 3799-3876, 1995.
- Welsh, M. J.; Ramsey, B.W.; Accurso, F.; Cutting, G.R. Cystic Fibrosis. *In*: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edn. New York, McGraw-Hill, pp. 5121-5188, 2001.
- Zeiger, B. G.; Eichwald, E.; Zarbner, J.; Smith, J. J.; Puga, A P.; McCray, P. B. Jr.; Capecchi, M. R.; Welsh, M. J.; Thomas, K. R. A mouse model for delta-F508 allele of cystic fibrosis. *J Clin Invest*, 96: 2051-2064, 1995.
- Zielenski, J.; Bozon, D.; Kerem, B.; Markiewicz, D.; Durie, P.; Rommens, J.M.; Tsui, L-C. Identification of mutations in exons 1 through 8 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10: 229-235, 1991.
- Zielenski, J.; Corey, M.; Rozmahel, R.; Markiewicz, D.; Aznarez, I.; Casals, T.; Larriba, S.; Mercier, B.; Cutting, G. R.; Krebssova, A; Macek, M. Jr.; Langfelder-Schwind, E.; Marshall, B. C.; Decelie-Germana, J.; Claustres, M.; Palacio, A; Bal, J.; Nowakowska, A; Ferec, C.; Estivill, X.; Durie, P.; Tsui, L. C. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet*, 22(2): 128-129, 1999.

BANCO DE DADOS ELETRÔNICO

Consórtium de Análise Genética de Fibrose Cística.

<http://www.genet.sickkids.on.ca/>

Parte 8

ANEXOS

	Pg.
8.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	93
8.1.1- COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	94
8.1.2- OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	95
8.2- MÉTODOS	96
8.2.1- PROTOCOLO LABORATORIAL	96
8.2.2- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE	100
8.2.3- PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	102
8.2.4- AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	103
8.2.5- ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE	109
8.2.6- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS CONFORMACIONAIS DE CADEIA SIMPLES	110
8.2.7- DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	113
8.2.8- FUNDAMENTAÇÃO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO	115
8.2.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA	117
8.3- RESULTADOS	118
8.3.1- EXEMPLIFICAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 7 POR PCR	118
8.3.2- EXEMPLIFICAÇÃO DA ANÁLISE DO EXON 7 POR SSCP	119
8.3.3- EXEMPLIFICAÇÃO DA ANÁLISE DO EXON 4 POR SEQÜENCIAMENTO DIRETO DE DNA DO GENE CFTR (Detecção da mutação R117H)	120
8.4- FICHA CLÍNICA DO PACIENTE	121

8.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A amostra analisada no presente estudo foi composta por 50 indivíduos afetados por FC não aparentados e diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O critério de inclusão do paciente no estudo foi a manifestação de sintomas clínicos pertinentes à doença e apresentar uma dosagem de eletrólitos no suor elevada. As informações sobre as características clínicas dos pacientes foram obtidas diretamente das fichas clínicas dos mesmos. Apenas um indivíduo portador de FC em cada família participou do estudo. Para a realização deste estudo, foram avaliados apenas os pacientes que nasceram no estado do Rio Grande do Sul.

A distribuição sexual da amostra ficou de acordo com o esperado para uma doença de herança autossômica recessiva, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois sexos (42% da amostra pertencia ao sexo feminino e 58% ao masculino). Os pacientes eram provenientes de várias origens étnicas, com predominância de descendentes de italianos (31,2%), alemães (18,2%) e portugueses (5,2%), o que representa 54,6%.

A grande maioria dos pacientes (41 dos 50) tinham entre 0 e 16 anos (82,0%) na época da coleta do material e apenas 9 pacientes tinham mais de 16 anos (18,0%).

Nesta amostra, 10 em 50 pacientes possuíam história conhecida de FC na família. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da existência de outros casos ou até mesmo de óbitos que não tenham sido diagnosticados. Finalmente, a grande maioria dos pacientes (74,0%) foi diagnosticada nos primeiros anos de vida (tabela 8.1).

Tabela 8.1: **Idade dos pacientes no momento do diagnóstico.**

Idade	Nº de pacientes
0 a 12 meses	28
12 a 24 meses	6
24 a 36 meses	3
36 a 48 meses	1
48 a 60 meses	2
60 a 72 meses	6
72 a 84 meses	1
84 a 96 meses	0
96 a 108 meses	1
108 a 120 meses	1
Acima de 120 meses	1
Total	50

8.1.1- COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Uma amostra de sangue de 5 a 10mL foi coletada por punção venosa e adicionada em frascos de vidro de 5mL contendo 0,054mL de EDTA (tipo vacutainer). Esta amostra foi devidamente identificada e armazenada a -20°C para posterior extração de DNA, a qual foi realizada no máximo duas semanas após a coleta.

8.1.2- OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (PRIMERS)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo foram desenhados a partir da seqüência do gene da FC (*GenBank* M55108 (exon 3), M55109 (exon 4), M55110 (exon 5), M55112 (exon 7), M55116 (exon 11), M55117 (exon 12), M55126 (exon 19), M55127 (exon 20), M55128 (exon 21) e M55129 (exon 22)). A seqüência dos mesmos encontra-se na tabela 8.2.

Tabela 8.2: **Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo.**

Exon	Nome do primer	Seqüência do primer (5'→3')	PRODUTO DE PCR	REFERÊNCIA
3	CF3i5'	CTTGGGTAAATCTCCTTGGA	309pb	Zielenski <i>et al.</i> , 1991
	CF3i3'	ATTCACCAGATTTCGTAGTC		
4	4i5'	TCACATATGGTATGACCCTC	232pb	Zielenski <i>et al.</i> , 1991
	4S3L	CCTAGATAAATCGCGATAG	224pb	
	4i3	TTGTACCAGCTCACTACCTA		
	4S1R	TATCGCGATTTATCTAGGC		
5	CF5i5'	ATTTCTGCCTAGATGCTGGG	395pb	Zielenski <i>et al.</i> , 1991
	CF5i3'	AACTCCGCCTTCCAGTTGT		
7	CF7A	GATCTTCCATTCCAAGATCCC	358pb	Streit <i>et al.</i> , 1999
	CF7B	ATCATAGTATATAATGCAGC		
9	CF9ii5'	TTTAACAGGGATTTGGG	199pb	Shackleton, <i>et al.</i> , 1996
	CF9ii3'	AGAACTACCTTGCCCTGC		
12	CF12A	CATCTACACTAGATGACCAGG	187pb	Streit <i>et al.</i> , 1999
	CF12B	GCATGAGCATTATAAGTAAGG		
19	CF19i5'	GCCCGACAAATAACCAAGTG	309pb	Zielenski <i>et al.</i> , 1991
	CFE2L	CTGTGAGATCTTTGACAGTC		
	CF19i3'	GCTAACACATTGCTTCAGGCT	204pb	
	CFF1R	ACGTGAAGAAAGATGACATC		
20	CF20ii5'	CACAGAAGTGATCCCATCA	259pb	Shackleton, <i>et al.</i> , 1996
	CF20ii3'	GTACAAGTATCAAATAGCAG		
22	CF22A	CTCTGTGGTATCTGAACTATC	264pb	Streit <i>et al.</i> , 1999
	CF22B	GGCATAATGATTCTGTTCCC		

8.2- MÉTODOS

8.2.1- PROTOCOLO LABORATORIAL

Uma amostra de sangue de cada indivíduo foi colhida e utilizada para extração de DNA do respectivo paciente. Este material foi utilizado no processo de amplificação de fragmentos específicos do gene da FC para toda a análise molecular.

A detecção da mutação $\Delta F508$ foi realizada em um estudo prévio. Os pacientes homocigotos para esta mutação já estavam com o seu genótipo estabelecido. O material dos pacientes heterocigotos para $\Delta F508$ ou os pacientes não portadores desta mutação foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões adjacentes aos exons 9, 10, 11, 20 e 21. Os produtos amplificados foram submetidos à análise pela técnica de SSCP e foram detectados alguns pacientes com alterações nos diferentes exons analisados, bem como pacientes sem alterações nestes exons. Os pacientes que portadores de alterações nos exons 9, 10 e 20 e os pacientes sem alterações nos exons analisados foram indicados para análise de outras regiões do gene ou para detecção específica das alterações encontradas. Os pacientes que possuíam alterações nos exons 11 e 21 foram submetidos a análise para detecção de mutações específicas nos exons 11 e 21, utilizando amplificação por PCR e posterior digestão com endonucleases de restrição. Desta forma, foram definidos os genótipos de alguns pacientes (Streit *et al.*, 1999).

Entretanto, em um grande número de pacientes não foram identificadas as duas alterações responsáveis pela doença, para estas amostras sucedeu-se a o presente estudo.

Este estudo consiste na amplificação de fragmentos de seqüências codificadoras de proteína, ou seja, exons 3, 4, 5, 7, 12, 19 e 22. Em seguida, as amostras foram submetidas para detecção de alterações na fita simples de DNA pela técnica de SSCP. As amostras que apresentaram um padrão de migração alterado durante a eletroforese, foram submetidas à digestão com endonuclease de restrição para a detecção de mutações específicas. As amostras que não apresentaram as mutações específicas pela técnica de RFLP foram seqüenciadas em um seqüenciador automático nas regiões compreendida pelos exons 9, 11, 20, 19 e 22 com a finalidade de detecção de mutações novas e/ou raras.

Além disso, foram analisadas por PCR do tipo *Touch down* com enzima altamente específica pela presença de anticorpo monoclonal, a presença do polimorfismo de politimidinas (poli T: 5T, 7T ou 9T) localizado no intron 8 do gene da FC. Após a determinação do genótipo do paciente, foi feita a correlação com o fenótipo (condição de azospermia) em pacientes do sexo masculino.

O protocolo utilizado está representado esquematicamente nas figuras 8.1 e 8.2.

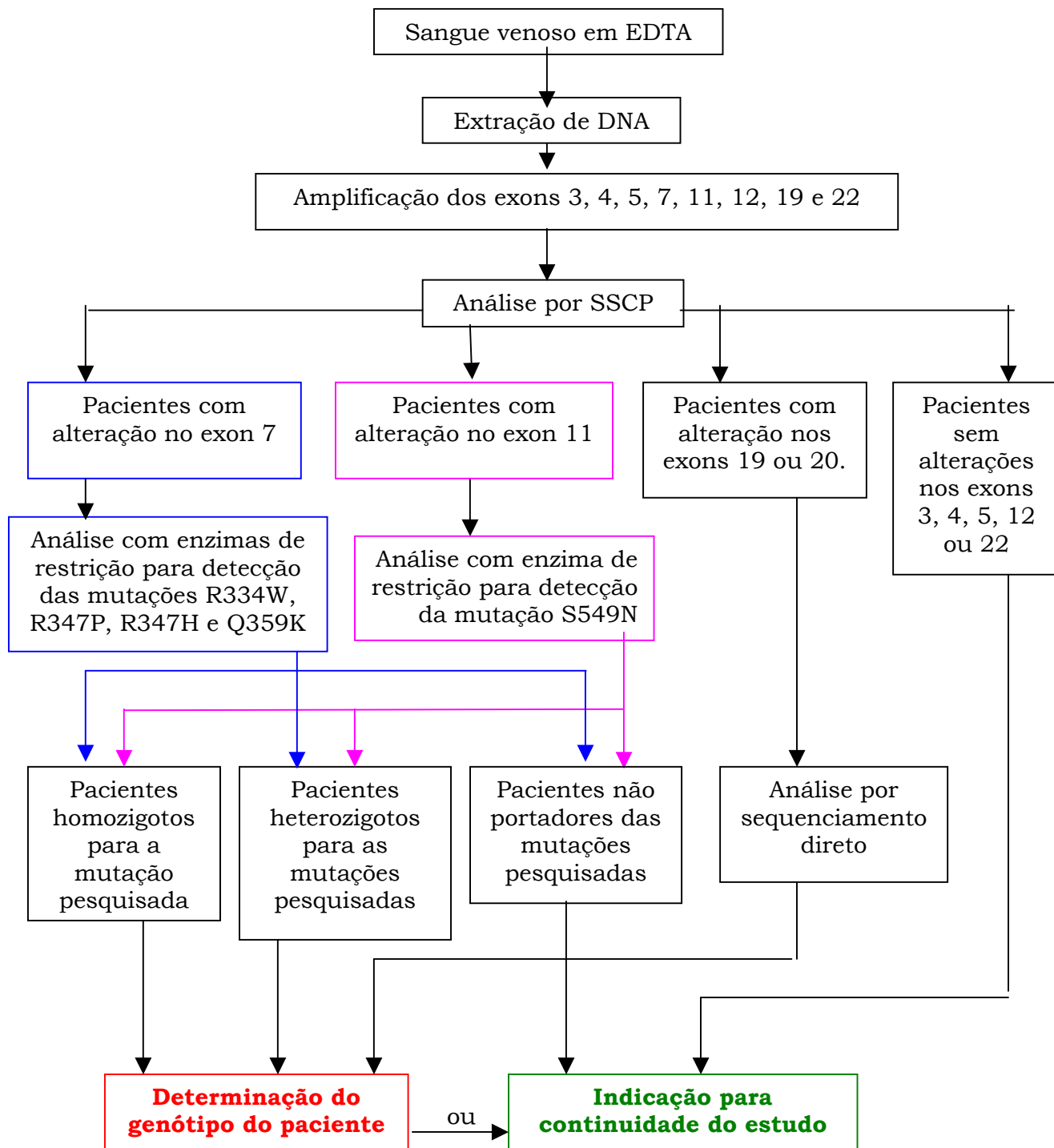


Figura 8.1: **Protocolo laboratorial empregado no presente estudo.**

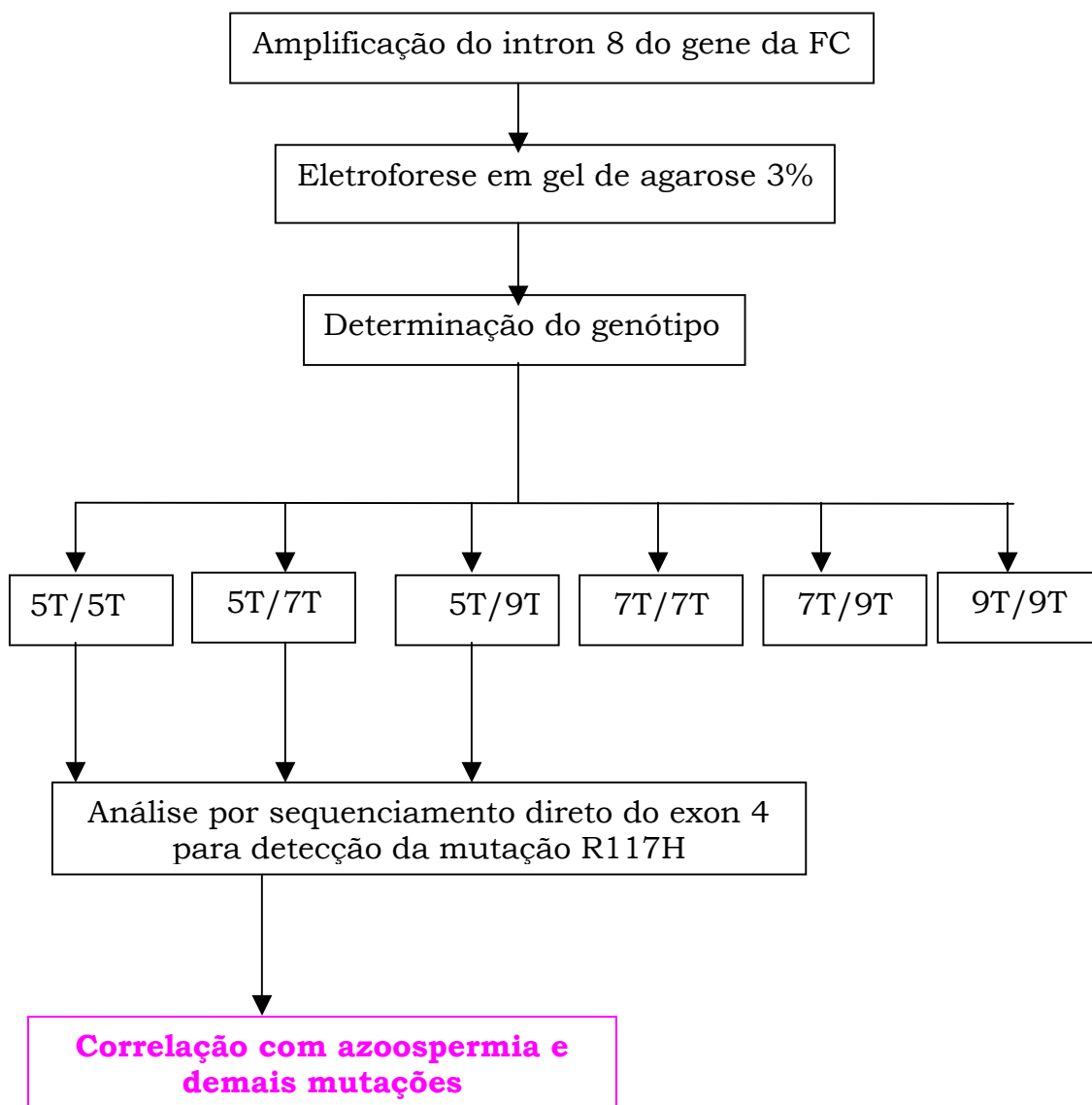


Figura 8.2: **Protocolo laboratorial empregado para a investigação de polimidinas no presente estudo.**

8.2.2.- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE SANGUE (Miller *et al.*, 1988)

O DNA genômico foi extraído a partir de 5 ou 10mL de sangue coletado em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,5M pH 8,0. Foi utilizado o método de precipitação com sais (*salting-out*), descrito a seguir:

- a) Transferir o sangue para um tubo plástico cônico estéril de 50mL (tipo Falcon) logo após o seu descongelamento.
- b) Adicionar água destilada esterelizada gelada até completar 50mL.
- c) Agitar a amostra em agitador de tubos (tipo vortex).
- d) Centrifugar a amostra por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente.
- e) Desprezar o sobrenadante.
- f) Adicionar 25mL de Triton X-100 0,1% (v/v) ao precipitado e homogeneizar por alguns segundos até a ressuspensão completa do precipitado.
- g) Centrifugar a solução por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente.
- h) Desprezar o sobrenadante.
- i) Adicionar ao precipitado 3mL de tampão de lise 1X (Tris-HCl 100mM pH 8,0; NaCl 4M; EDTA 20mM pH 8,2).
- j) Agitar a solução no agitador de tubos durante aproximadamente 20 segundos.
- k) Adicionar 120 μ L da solução de proteinase K (10mg/mL) e 200 μ L de SDS 10% (p/v).
- l) Agitar rapidamente a solução no agitador de tubos.
- m) Incubar a amostra a 37°C durante 12 a 16 horas.
- n) Adicionar 1mL de acetato de amônio 9,6M.
- o) Homogeneizar no agitador de tubos por 15 segundos.
- p) Deixar a amostra em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.
- q) Centrifugar a solução durante 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente.
- r) Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro de 20mL estéril.
- s) Adicionar ao sobrenadante 10ml de etanol absoluto gelado.
- t) Misturar levemente por inversão.

- u) Retirar o DNA e transferir para um tubo de plástico cônico de 1,5mL (tipo Eppendorf).
- v) Ressuspender em 150 a 200 μ L de TE, ou mais dependendo da quantidade de DNA obtida (Tris 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0).
- x) A solução deve ser mantida em temperatura ambiente durante alguns minutos e posteriormente armazenada a -20°C até o momento de uso.

Uma alíquota de 10 μ L da solução de DNA foi colocada em um tubo de plástico cônico de 1,5mL (Eppendorf) e diluída até 500 μ L com água Milli-Q. A amostra foi homogeneizada para uma posterior leitura da concentração do DNA em espectrofotômetro ($\lambda=260\text{nm}$).

Com base na concentração obtida da solução de DNA foi calculada uma nova diluição para uma concentração final de aproximadamente 100ng/ μ L.

8.2.3- PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO (Ausubel *et al.*, 1997)

As amostras de DNA que apresentaram problemas na amplificação pela técnica de PCR foram submetidos a um processo adicional de precipitação, conforme o protocolo abaixo:

- a) Adicionar à solução de DNA 1/10 do volume inicial de solução de acetato de sódio 3M pH 7,0.
- b) Adicionar 2,5 vezes o volume inicial de etanol absoluto gelado.
- c) Homogeneizar o material por inversão.
- d) Colocar o material no freezer a - 70°C por 30 minutos ou a - 20°C por 2 horas.
- e) Centrifugar os tubos por 10 minutos a 14000 rpm em temperatura ambiente.
- f) Descartar o sobrenadante.
- g) Lavar o precipitado com 100µL de solução de etanol 70% (v/v).
- h) Centrifugar novamente por 5 minutos a 14000rpm em temperatura ambiente.
- i) Descartar o sobrenadante.
- j) Secar o precipitado em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos (até a completa evaporação do álcool).
- k) Diluir o precipitado em um volume de solução de TE (Tris 10mM pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0), igual ao volume inicial.

8.2.4- AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) (Newton e Graham, 1994)

No presente estudo, foram amplificadas cinco regiões do gene da FC, os quais codificam regiões importantes para a atividade proteica por apresentarem sítios de ligação para o ATP. A seqüência dos *primers* e sua localização, bem como os nucleotídeos alterados pelas mutações pesquisadas neste estudo encontram-se na figura 8.3.

Todos os *primers* foram diluídos com água Milli-Q até uma concentração de 1000 $\mu\text{moles}/\mu\text{L}$ (solução estoque). A solução de uso foi preparada para uma concentração de 10 $\mu\text{moles}/\mu\text{L}$.

As reações de amplificação por PCR foram preparadas conforme especificações nas tabelas 8.3 e 8.4. Paralelamente aos tubos testes, um tubo branco foi preparado para cada bateria de PCR, substituindo o DNA por água Milli-Q estéril.

EXON 3 (GenBank M55108)

aggaatctgc cagatatctg gctgagtggt tgggtgttgta tgggtctccat gagattttgt
 ctctataata cttgggttaa tctccttgga tataacttggt tgaatcaaac tatgttaagg
 gaaataggac aactaaaata tttgcacatg caacttattg gtcccacttt ttattctttt
 gcagagaatg ggatagagag ctggcttcaa agaaaaatcc taaacctatt aatgccttc
ggcgatgttt ttctcggaga tttatgttct atggaatctt tttatattta gggtaagga
 tctcatttgt acattcatta tgtatcacat aactatatgc atttttgtga ttatgaaaag
actacgaaat ctggtgaata ggtgtaaaaa tataaaggat gaatccaact ccaaactacta
 agaaaccacc taaaactcta gtaaggataa gtaa

EXON 4 (GenBank M55109)

ccactattca ctgtttaact taaaatacct catatgtaaa cttgtctccc actggttgcta
 taacaaatcc caagcttat ttcaaagtac caagatattg aaaatagtgc taagagtttc
acatatgga tgaccctcta tataaaactca ttttaagtct cctctaaaga tgaaaagtct
tgtgttgaaa ttctcagggt attttatgag aaataaatga aatttaattt ctctgttttt
 ccccttttgt aggaagtcac caaagcagta cagcctctct tactgggaag aatcatagct
tcctatgacc cggataacaa ggaggaacgc tctatcgca tttatctagg cataggctta
tgcttctct ttattgtgag gacactgctc ctacaccag ccatttttgg ccttcacac
attggaatgc agatgagaat agctatgttt agtttgatt ataagaaggt aatacttctc
tgacagggc ccatggcaca tatattctgt atcgtacatg ttttaatgtc ataaattagg
 tagtgagctg gtacaagtaa gggataaatg ctgaaattaa ttttaatatgc ctattaaata
 aatggcagga ataattaatg ctcttaatta tccttgataa ttttaattgac ttaaactgat
 aattattgag tatc

EXON 5 (GenBank M55110)

taattatctc tgcttagatg ctgggaaata aaacaactag aagcatgcca gtataatatt
 gactgttgaa agaaacattt atgaacctga gaagatagta agctagatga atagaatata
 attttcatta ctttactta ataatgaatg cataataact gaattagtca tattataatt
 ttacttataa tatatttgta ttttgtttgt tgaaattatc taactttcca tttttctttt
 agactttaaa gctgtcaagc cgtgttctag ataaaataag tattggacaa cttggttagtc
tcctttccaa caacctgaac aaatttgatg aagtatgtac ctattgattt aatcttttag
 gcaactattgt tataaattat acaactggaa aggcggagtt ttcttgggtc agataatagt
 aattagtgtg taagtcttgc tcagctctag cttccctatt ctggaaacta agaaaggcca
 attgtatagc agagacccat tctgggtct ggtagaacca cccaactcaa aggcacctta
 gcctgttgtt aataagattt ttcaaaactt aattcttatc agaccttgct tcttttaaac

Figura 8.3: **Seqüência de oligonucleotídeos de regiões do CFTR.** Introns estão representados em preto e os exons estão representados em azul. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada caso encontram-se sublinhados.

EXON 7 (GenBank M55112)

```

tttacaagta ctacaagcaa aacctggta ctttcattgt tatcttttca tataaggtaa
ctgaggccca gagagattaa ataacatgcc caaggtcaca caggtcatat gatgtggagc
caggttaaaa atataggcag aaagactcta gagaccatgc tcagatcttc cattccaaga
tccctgatat ttgaaaaata aaataacatc ctgaatttta ttgttattgt tttttataga
acagaactga aactgactcg gaaggcagcc tatgtgagat acttcaatag ctcagccttc
ttcttctcag ggttctttgt ggtgttttta tctgtgcttc cctatgcact aatcaaagga
atcatcctcc ggaaaaatatt caccaccatc tcattctgca ttgttctgcg catggcggtc
actcggaat ttccctgggc tgtacaaaca tggatgact ctcttgagc aataaaciaa
atacaggttaa tgtaccataa tgctgcatta tatactatga tttaaataat cagtcaatag
atcagttcta atgaactttg caaaaatgtg cgaaaagata gaaaaagaaa tttccttcac
taggaagtta taaaagttgc cagctaatac taggaatgtt caccttaaac ttttcctagc
atcttctctg acagtatgat ggatgagagt ggcatttatg caaattacct taaaatccca
ataatactga tgtagctagc agctttgaga aa

```

EXON 11 (GenBank M55116)

```

atatacccat aaatatacac atattttaat ttttggatt ttataattat tatttaatga
tcattcatga cattttaaaa attacaggaa aaatttacat ctaaaatttc agcaatggtt
tttttgacca actaaataaa tgcatttga aataatggag atgcaatggt caaaatttca
actgtggtta aagcaatagt gtgatatatg attacattag aaggaagatg tgcctttcaa
atcagattg agcatactaa aagtgactct ctaattttct atTTTTGGTA ataggacatc
tccaagtttg cagagaaaga caatatagtt cttggagaag gtggaatcac actgagtgga
ggtcaacgag caagaatttc tttagcaagg tgaataacta attattgggc tagcaagcat
ttgctgtaa tgcattcat gtaaaaaaat tacagacatt tctctattgc tttatattct
gtttctggaa ttgaaaaaat cctgggggtt tatggctagt gggttaagaa tcacatttaa
gaactataaa taatggtata gtatccagat ttggtagaga ttatggttac tcagaatctg
tgcccgtatc ttgg

```

EXON 12 (GenBank M55117)

```

cttacagtta gcaaaatcac ttcagcagtt cttggaatgt tgtgaaaagt gataaaaatc
ttctgcaact tattccttta ttcctcattt aaaataatct accatagtaa aaacatgtat
aaaagtgcta cttctgcacc acttttgaga atagtgttat ttcagtgaat cgatgtgggtg
accatattgt aatgcatgta gtgaactggt taaggcaaat catctacact agatgaccag
gaaatagaga ggaatgtaa ttaatttcc attttcttt tagagcagta tacaagatg
ctgattgta ttattagac ttccttttg gatacctaga tgttttaaca gaaaaagaaa
tatttgaaag gtatgttctt tgaatacctt acttataatg ctcatgctaa aataaaagaa
agacagactg tcccatcata gattgcattt tacctcttga gaaatatggt caccattggt
ggtatggcag aatgtagcat ggtattaact caaatctgat ctgcctact gggccaggat
tcaagattac ttccattaaa accttttctc accgcctcat gctaaaccag tttctctcat
tgctatactg ttatagcaat tgctatctat gtagtttttg cagtatcatt gccttgtgat
atatattact ttaatt

```

Figura 8.3 (Continuação): **Seqüência de oligonucleotídeos de regiões do CFTR.** Introns estão representados em preto e os exons estão representados em azul. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada caso encontram-se sublinhados.

EXON 19 (*GenBank* M55126)

ttctcttcag ttaaactttt aattatatcc aattattttcc tgttagttca ttgaaaagcc
cgacaaataa ccaagtgaca aatagcaagt gttgcatttt acaagttatt ttttaggaag
 catcaaacta attgtgaaat tgtctgccat tcttaaaaac aaaaatggtg tttttttat
 ttcagatgcg atctgtgagc cgagcttta agttcattga catgccaca gaaggtaaac
ctaccaagtc aaccaaacca tacaagaatg gccaaactctc gaaagttatg attattgaga
 attcacacgt gaagaaagat gacatctggc cctcaggggg ccaaagttatg gtcaaagatc
 tcacagcaaa atacacagaa ggtggaaatg ccatattaga gaacatttc ttctcaataa
gtcctggcca gagggtgaga tttgaacact gcttgctttg ttagactgtg ttcagtaagt
 gaatcccagt agcctgaagc aatgtgtag cagaatctat ttgtaacatt attattgtac
 agtagaatca atattaaaca cacatgtttt attatatgga gtcattattt ttaatatgaa
 atttaatttg cagagtctga actatata

EXON 20 (*GenBank* M55127)

aaaggtcagt gataaaggaa gtctgcatca ggggtccaat tccttatggc cagtttctct
 attctgttcc aaggttgttt gtctccatat atcaacattg gtcaggattg aaagtgtgca
 acaaggtttg aatgaataag tgaaaatctt ccaactggtg caggataaaa tattccaatg
 gtttttattg aagtacaata ctgaattatg tttatggcat ggtacctata tgctacagaa
gtgatcccat cacttttacc ttataggtgg gcctcttggg aagaactgga tcaggaaga
gtactttgtt atcagctttt ttgagactac tgaacactga aggagaaatc cagatcgatg
gtgtgtcttg ggattcaata actttgcaac agtggaggaa agcctttgga gtgataccac
aggtgagcaa aaggacttag ccagaaaaaa ggcaactaaa ttatattttt tactgctatt
tgatacttgt actcaagaaa ttcattattc tctgcaaaat atatttgta tgcttgctg
 tctttttttt ctccagtgca gttttctcat aggcagaaaa gatgtctcta aaagtttggg
 aattc

EXON 22 (*GenBank* M55129)

cacagttgac tttttatgc tatcttttgt cctcagtcac gacagagtag aagatgggag
 gtagcaccaa ggatgatgac atacctccat cttttatgct acattctatc ttctgtctac
 ataagatgac aactagaggg gcatatctgc aatgtataca tattatcttt tccagcatgc
 attcagttgt gttggaataa tttatgtaca cttttataaa cgctgagcct cacaagagcc
 atgtgccacg tattgtttct tactactttt ggatacctgg cacgtaatag acactcattg
 aaagtttctt aatgaatgaa gtacaaagat aaaacaagtt atagactgat tcttttgagc
 tgtcaaggtt gtaaatagac ttttgctcaa tcaattcaaa tgggtggcagg tagtgggggt
 agagggattg gtatgaaaaa cataagcttt cagaactcct gtgtttattt ttagaatgct
aactgcttga gtgtttttaa ctctgtggta tctgaactat cttctctaac tgcatggtg
gctcagatct gtgatagaac agtttctctg gaagcttgac tttgtccttg tggtggggg
ctgtgtccta agccatggcc acaagcagtt gatgtgcttg gctagatctg ttctcagtaa
ggcgaagatc ttgtctcttg atgaaccag tgctcatttg gatccagtg gagtttcaga
 tgttctgta cttaatagca cagtgggaac agaatcatta tgctgcttc atgggtgacac
 atatttctat taggctgtca tgtctgcgtg tgggggtctc ccaagatag aaataattgc
 ccagtggaaa tgagcataaa tgcatatttc cttgctaaga gttcttgtgt tttcttccga
 agatagtttt

Figura 8.3 (Continuação): **Seqüência de oligonucleotídeos de regiões do CFTR.** Introns estão representados em preto e os exons estão representados em azul. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada caso encontram-se sublinhados.

Tabela 8.3: Protocolo básico para as reações de amplificação por PCR.

Soluções	1X
DNTPs	2,50 μ L
Tampão de PCR 10X (contendo 15 ou 25mM MgCl ₂)	2,50 μ L
Primer A (10 ρ mol/ μ L)	2,50 μ L
Primer B (10 ρ mol/ μ L)	2,50 μ L
<i>Taq.</i> DNA polimerase (5U/ μ L)	0,25 μ L
Água q.s.p.	23,00 μ L
DNA (100ng/ μ L)	2,00 μ L
Volume final	25,00 μ L

Tabela 8.4: **Condições de amplificação.**

	Estágios	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo (min)
1º Passo	Desnaturação inicial	1	94°C	5
2º Passo	{ Desnaturação	30	94°C	1
	{ Anelamento		55°C a 60°C	1
	{ Extensão		72°C	1 a 3
3º Passo	Extensão final	1	72°C	5

8.2.5- ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS EM GEL DE AGAROSE

(Ausubel *et al.*, 1997)

A amplificação do fragmento desejado foi confirmada pela análise do produto por eletroforese realizada em gel de agarose a 1,5% ou 2,0% (p/v) em solução de TBE 1X, de acordo com o tamanho do fragmento em análise. Uma alíquota de 5 μ L do volume final do produto amplificado foi adicionada à 1,0 μ L de tampão contendo 0,25% (p/v) xileno cianol e 15% (p/v) ficol e submetido à separação eletroforética a 100V por 40 minutos. Paralelamente às amostras, foi analisado um marcador de peso molecular de 100pb. A visualização do fragmento amplificado foi realizada pelo coramento do gel com solução de brometo de etídio e transiluminação com luz ultravioleta.

8.2.6- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS CONFORMACIONAIS DE CADEIA SIMPLES (SSCP OU SSCA) (Orita *et al*, 1989a e Orita *et al*, 1989b)

As regiões que compreendem os exons 3, 4, 5, 7, 12, 19 e 22 foram amplificadas conforme as tabelas 8.3 e 8.4 e submetidos à análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP). A aplicação deste protocolo visa à identificação de alterações na seqüência de nucleotídeos de um pequeno fragmento de DNA.

Uma alíquota de 8 μ L de produto de PCR foi adicionada a 5 μ L de tampão contendo 0,25% (p/v) azul de bromofenol, 0,25% (p/v) xileno cianol e 15% (p/v) ficol; em um tubo plástico cônico de 0,5mL (tipo Eppendorf) e as amostras foram desnaturadas em termociclador por 10 minutos a 99°C. Decorrido este período, estas amostras foram transferidas para um banho de gelo e mantidas durante 5 minutos. Uma alíquota de 6 μ L do material desnaturado foi aplicada na canaleta do gel de MDE[®] 6% (17,5mL de MDE[®]; 38,5mL de água; 350 μ L de APS 10%; 40 μ L de TEMED; 14mL de solução de TBE 5X). A solução de TBE 5X foi preparada da seguinte forma: 54g de trizma base; 27,5g de ácido bórico; 20mL de EDTA 0,5M pH 8,0. A separação eletroforética foi realizada a 5W por um tempo variável, de acordo com o tamanho do fragmento a ser analisado (tabela 8.5).

A revelação do gel foi realizada conforme protocolo abaixo utilizando solução de nitrato de prata.

- a) Cobrir o gel com solução de etanol a 10% (v/v) durante 5 minutos para fixar as amostras.
- b) Transferir o gel para solução de ácido nítrico 1% (v/v) durante 3 minutos para oxidar o gel.
- c) Lavar o gel com água destilada e deionizada durante poucos segundos.
- d) Cobrir o gel com solução de nitrato de prata 0,012M durante 20 minutos para impregnação com prata.
- e) Lavar o gel com água destilada e deionizada durante poucos segundos.
- f) Revelar o gel com solução de carbonato de sódio anidro 0,28M e 250 μ L formaldeído 37% (v/v), até que as bandas apareçam por completo (aproximadamente 15 minutos) para revelar o gel.

- g) Parar o processo de revelação adicionando solução de ácido acético a 10% (v/v) durante 2 minutos.
- h) Lavar o gel com água destilada e deionizada durante poucos segundos.
- i) Cobrir o gel com solução de etanol 50% (v/v) durante 30 minutos para encolher o mesmo.

O gel foi então transferido para papel Whatman e colocado para secar em um secador de gel a vácuo. O mesmo foi mantido durante 25 minutos a uma temperatura de 65°C até a secagem completa.

Tabela 8.5: **Fragmentos do gene CFTR analisados neste estudo.**

Exon	Primer	Tamanho do fragmento	Tempo de eletroforese
3	3i5'/3i3'	309pb	22 horas
4	4i5'/4S3L	232pb	20 horas
	4i3'/4S1R	234pb	20 horas
5	5i5'/5i3'	395pb	38 horas
7	7A/7B	358pb	28 horas
12	12A/12B	187pb	18 horas
19	19i5'/E2L	309 pb	24 horas
	19i3'/F1R	204 pb	18 horas
22	22A/22B	264pb	21 horas

8.2.7- DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Todos os indivíduos que apresentaram alterações no exon 7 pela a técnica de SSCP foram testados para as mutações R334W, R347P, R347H e Q359K. Do mesmo modo, os indivíduos que apresentam alterações no exon 11, foram submetidos à detecção da mutação S549N. Um sumário das mutações estudadas e o protocolo de detecção pode ser encontrado na tabela 8.6.

a) Reação de clivagem: A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20 μ L, os quais continham os seguintes reagentes:

Tampão da enzima de restrição (10X)	2,0 μ L
Enzima de restrição (10U/ μ L)	1,0 a 3,0 μ L
Produto de PCR	10 μ L
Água q.s.p.	20 μ L

Para as reações com a enzima de restrição *Bst*NI foram adicionados à reação 2 μ L de BSA 10mg/mL por amostra analisada.

b) Eletroforese dos produtos da digestão: uma alíquota de 15 μ L do produto da reação foi adicionada a 2 μ L do tampão contendo 0,25% (p/v) xileno cianol e 15% (p/v) ficol. Após a aplicação no gel de poliacrilamida 10% (p/v) (28mL de acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%), 112mL de tampão tris ácido bórico EDTA 1X; 1400 μ L de persulfato de amônio 10%; 200 μ L de tetrametiletilenodiamina), o material foi submetido a uma separação eletroforética a 300V durante um período de 2 horas a 5 horas e 30 minutos, conforme o tamanho dos fragmentos esperados. A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada pelo coramento do gel com solução de brometo de etídio e transiluminação com luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos resultantes foram comparados com os padrões de marcadores de peso molecular de 50pb e 100pb.

Tabela 8.6: **Deteção das mutações R334W, R347H, R347P, Q359K, S549N e W1282X. no gene CFTR.**

Exon	Mutação	Enzimas	Produto de PCR	Fragmento esperado		
				Ausência da Mutação	Presença da Mutação	
7	R334W	<i>MspI</i>	358pb	206pb + 152pb	358pb	
	R347H	<i>HhaI</i>	358pb	247pb + 111pb	358pb	
	R347P	<i>NcoI</i>	358pb	358pb	247pb + 111pb	247pb + 111pb
		<i>HhaI</i>	358pb	247pb + 111pb	358pb	358pb
	Q359K	<i>RsaI</i>	358pb	280pb + 78pb	358pb	
11	S549N	<i>DdeI</i>	389pb	138pb + 251pb	389pb	
20	W1282X	<i>MnII</i>	292pb	80pb + 106pb + 106pb	80pb + 212pb	

8.2.8- FUNDAMENTAÇÃO DA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Este protocolo se baseia na amplificação de uma região de DNA genômico adjacente à mutação com oligonucleotídeos iniciadores específicos. Utilizando os *primers* específicos, os fragmentos de diferentes tamanhos foram amplificados e a seguir, submetidos a digestão com endonuclease de restrição. Para a detecção das mutações foram usadas enzimas de restrição que têm a capacidade de reconhecer seqüências específicas do DNA genômico amplificado.

R334W

A troca de citosina por timina no nucleotídeo 1132 (5' TC**C**GG 3') resulta em uma substituição de arginina por triptofano no aminoácido 334 da proteína. Esta troca destrói o sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição *MspI* (5' C↓CGG 3').

R347H

Esta mutação é causada pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 1172 do DNA genômico (seqüência 5' GC**G**CA 3'), levando à substituição de arginina por histidina na posição 347 da proteína. Esta transição ocasiona a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *HhaI* (5' GCG↓C 3').

R347P

A troca de uma guanina por uma citosina no nucleotídeo 1172 no exon 7 é responsável pela substituição de arginina por prolina no aminoácido 347 da proteína. A digestão realizada com a enzima *HhaI* cria um sítio de restrição em fragmentos não alterados por esta mutação. A mutação destrói o sítio de restrição na presença da enzima *HhaI* (5' GCG↓C 3') e cria um sítio de reconhecimento para a enzima *NcoI* (5' C↓CATGG 3') no codon 347 na seqüência 5' GC**G**CA 3' do gene CFTR.

Q359K

A substituição de uma citosina por uma adenina no nucleotídeo 1207 (seqüência 5' TACAA 3') no exon 7 é responsável pela troca de ácido glutâmico por lisina no aminoácido 359 da proteína. Na presença da mutação, a digestão realizada com a enzima *RsaI* elimina um sítio de restrição (5' GT↓AC 3').

S549N

A mutação do tipo transição implica na substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1778 do exon 11 do gene da fibrose cística (seqüência 5' GAGTG 3'). A mutação destrói o sítio de reconhecimento para a enzima *DdeI* (5' C↓T^{ACGT}AG 3'), ou seja, na ausência da mesma o fragmento é clivado em 2 outros fragmentos de tamanho menor.

W1282X

Esta mutação é causada pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 3978 do DNA genômico (seqüência 5' TGGAG 3'), levando à formação do códon de terminação no resíduo 1282 da proteína. Esta transversoção ocasiona a perda do sítio de reconhecimento para a enzima *MnII* (5' CCTC 3').

8.2.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi dividida em duas partes. A inferencial e a descritiva. Para os dados sócio-demográficos foi utilizada a estatística descritiva. Para verificar se haviam diferenças nas mutações entre a população em estudo e a população mundial, foi utilizado o teste exato de Fisher.

Deste modo as médias foram, então, comparadas entre os diferentes grupos em estudo pela técnica de análise de variância de um critério (ANOVA *oneway*) com localização de diferenças estatisticamente significativas pelo teste de *post hoc* de *Duncan*. (métodos de múltiplas comparações). Os resultados também foram avaliados pelo teste do Qui-quadrado para correção de continuidade e teste exato de *Fisher*. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$, sendo os dados analisados com auxílio do programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 10.0. Para a avaliação os dados foram submetidos ao programa EPIINFO versão 6.04B.

8.3 – RESULTADOS

8.3.1- EXEMPLIFICAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO EXON 7 POR PCR



Figura 8.4: **Amplificação do exon 7 do gene CFTR.** Análise eletroforética dos produtos de PCR em gel de agarose 2,0% (p/v) corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100pb; canaletas 2 a 11: pacientes com FC a serem analisados; canaleta 12: controle negativo da reação.

8.3.2- EXEMPLIFICAÇÃO DA ANÁLISE DO EXON 7 POR SSCP

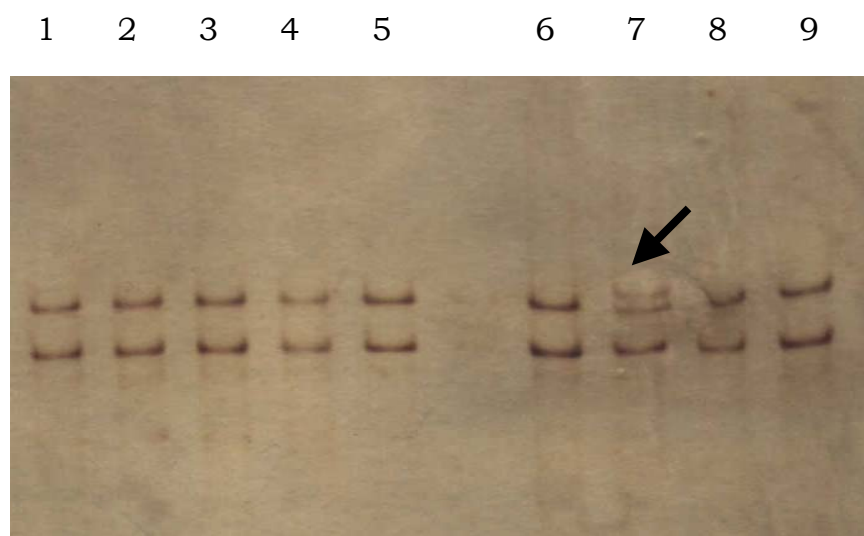


Figura 8.5: **Análise do exon 7 pela técnica de SSCP do gene CFTR.** Eletroforese dos produtos de PCR desnaturados em gel com MDE corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 6, 8 e 9: pacientes com FC que não apresentam alterações na seqüência gênica analisada; canaleta 7: paciente que apresenta alteração nesta análise.

8.3.3- EXEMPLIFICAÇÃO DA ANÁLISE DO EXON 4 POR SEQÜENCIAMENTO DIRETO DO DNA DO GENE CFTR (Detecção da mutação R117H)



Figura 8.6: **Análise do exon 4 pela técnica de seqüenciamento direto de DNA.** Paciente com FC que não apresenta a mutação R117H (primer utilizado no sentido 3' a 5').

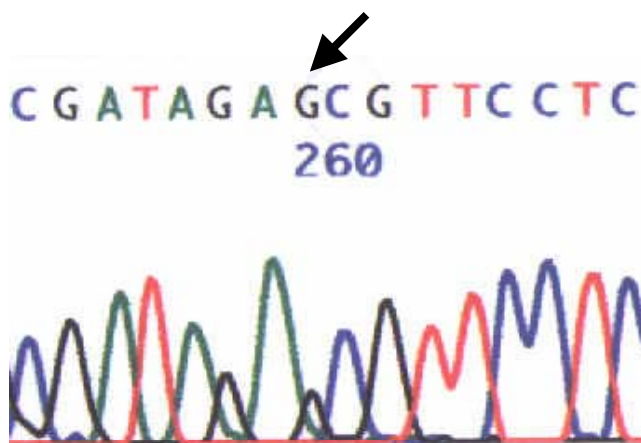


Figura 8.7: **Análise do exon 4 pela técnica de seqüenciamento direto de DNA.** Paciente com FC que não apresenta a mutação R117H (primer utilizado no sentido 5' a 3').

8.4- FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

SERVIÇO DE GENÉTICA MÉDICA - HCPA
PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome do paciente:

Data de nascimento:

Sexo: () Feminino

() Masculino

Cor: branca

Naturalidade:

Registro / HCPA:

Nome do pai:

Nome da mãe:

Endereço:

Telefone:

Cidade:

Estado: RS

CEP:

Idade na época do diagnóstico:

Data da coleta:

Apresentava sintomas clínicos na época do diagnóstico: () sim () não

Outros casos na família: () sim () não

Ascendência Étnica: _____

Avô paterno:

Avó paterna:

Avô materno:

Avó materna:

HEREDOGRAMA:

DADOS LABORATORIAIS

ANÁLISE MOLECULAR:

Procedimento

Resultado

Data

MUTAÇÕES ENCONTRADAS:
