

Édina Poletto¹; Marina Siebert^{1,2,3}; Mariana Fitarelli-Kiehl⁴; Maria Teresa Sanseverino²; Fernando de Abreu e Silva⁵; Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,3,4,6}

¹Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental, ²Serviço de Genética Médica – HCPA; ³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, ⁴Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular; ⁵Serviço de Pneumologia e ⁶Depto. de Bioquímica – UFRGS (email: mlpereira@hcpa.ufrgs.br).

1. Introdução

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (*CFTR*). O gene *CFTR* codifica uma proteína que atua como canal de Cl⁻ em células epiteliais em condições normais. Alterações nessa proteína comprometem o transporte de Cl⁻ no epitélio, levando à formação de secreções mais espessas em vários tecidos, principalmente no pâncreas e nos tratos respiratório e gastrointestinal. O diagnóstico da FC é realizado pela observação das manifestações da doença nos diferentes tecidos e pela estimativa da concentração de eletrólitos no suor, visto que portadores da doença apresentam secreção de Cl⁻ elevada¹.

O gene *CFTR* está localizado no braço longo do cromossomo 7, sendo dividido em 27 éxons. Aproximadamente 1900 mutações já foram identificadas nesse gene e 8,4% delas estão no éxon 13.

O elevado número de variações no gene dificulta a utilização de ensaios moleculares convencionais para o diagnóstico da doença – dessa maneira, metodologias de triagem se tornam necessárias para agilizar o processo².

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi identificar variações de sequência no domínio regulatório (éxons 13 e 14A) do gene *CFTR* de pacientes com FC.

3. Material e métodos

A partir de sangue em EDTA, o DNA de 20 pacientes com diagnóstico clínico de FC e de 5 indivíduos normais (grupo controle) foi isolado pelo método de precipitação em excesso de sais, quantificado por método fluorimétrico e diluído a 10ng/μL. As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, com uso de fluoróforo saturante na reação e de uma etapa final de dissociação – ambos necessários para obtenção da curva de dissociação da amostra. Posteriormente, as curvas foram analisadas pelo programa HRM v.2.0.1.

4. Resultados

Os resultados das análises do éxon 14A demonstram a ocorrência de um perfil de curva de dissociação de DNA diferente do perfil normal. Esse perfil foi encontrado em 9 pacientes. Os 11 pacientes restantes apresentaram perfis semelhantes aos normais (Figura 1).

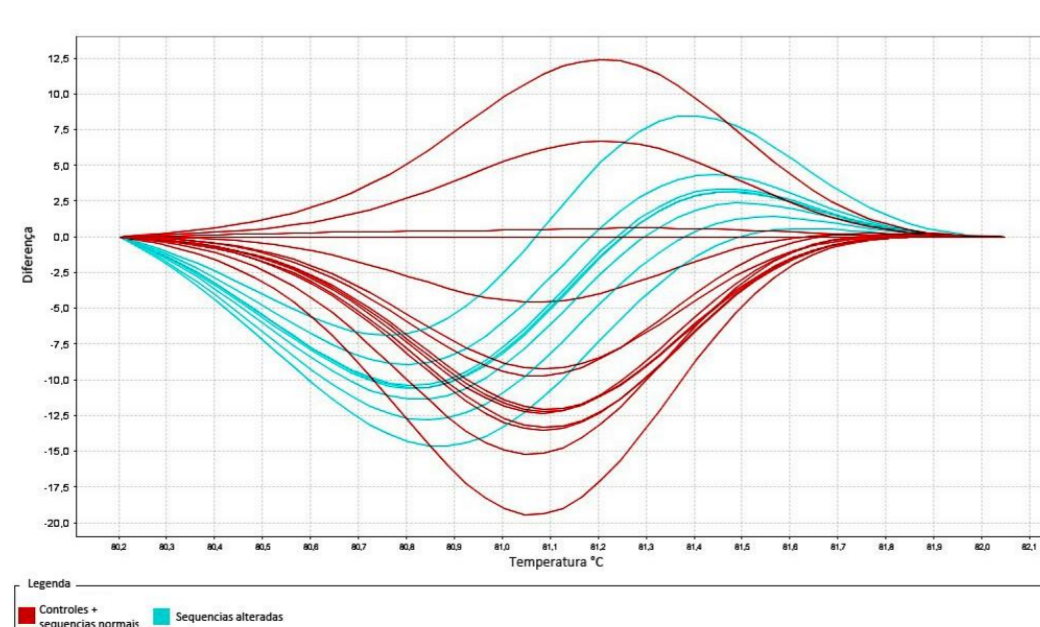


Figura 1. Análise por HRM do éxon 14A do gene *CFTR*. As curvas em vermelho identificam amostras controles (sem alterações na sequência de DNA) e amostras de pacientes com sequência de DNA normal nessa região. As curvas em azul demonstram perfil de dissociação de amostras com alterações na sequência de DNA.

Referências

1. Welsh *et al.*, 2001. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). McGraw, New York, pp 5121-5180.
2. Grody *et al.*, 2001. *Genet in Med* 3(2):149-154
3. Reed *et al.*, 2001. *Pharmacogenomics* 2007, 8(6): 597-608
4. Nikolic A *et al.*, 2001. *Balkan J Med Genet* 4: 11-14.

Todas as amostras foram submetidas a sequenciamento direto de DNA para identificação da alteração na sequência. O resultado do sequenciamento demonstrou que as amostras semelhantes aos controles apresentam sequências normais e que, dentre as alteradas, todas são heterozigotas para a mesma variação polimórfica (c.2562T>G) (Figura 2).

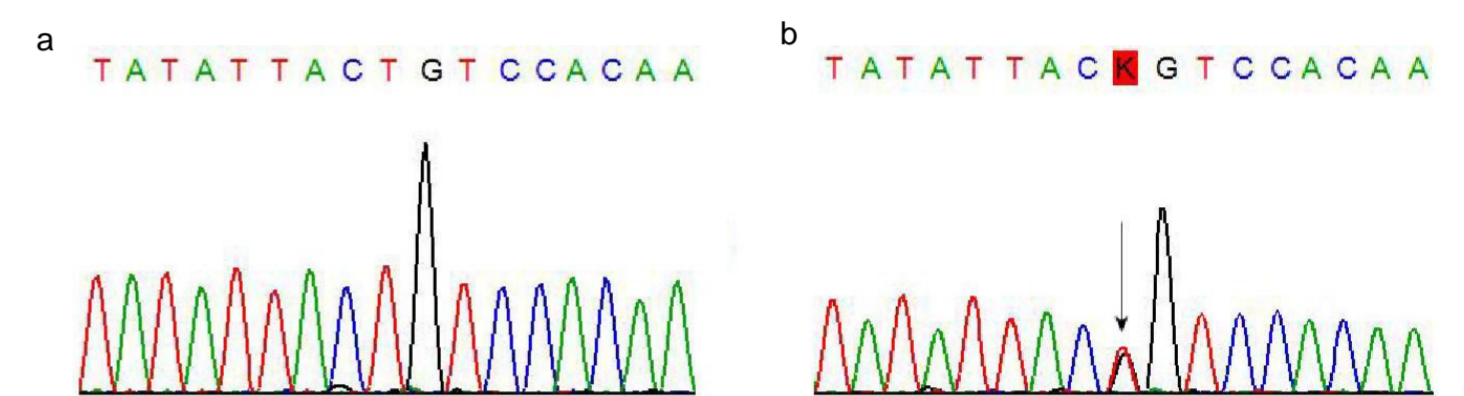


Figura 2. Sequenciamento de DNA de parte do éxon 14^a do gene *CFTR*. Sequenciamento direto realizado a partir do *primer* direto. (a) A sequência representa alelos normais para região. (b) A seta indica a substituição de T para G em um dos alelos, ocasionando o polimorfismo c.2562T>G.

A análise de parte do éxon 13 mostrou diferença nos perfis de curva de dissociação entre controles, indicando a possível presença de polimorfismos no grupo e em parte dos pacientes. Além disso, 8 pacientes apresentaram perfil de curva diferente, sugerindo variação de sequência diferente das demais (Figura 3).

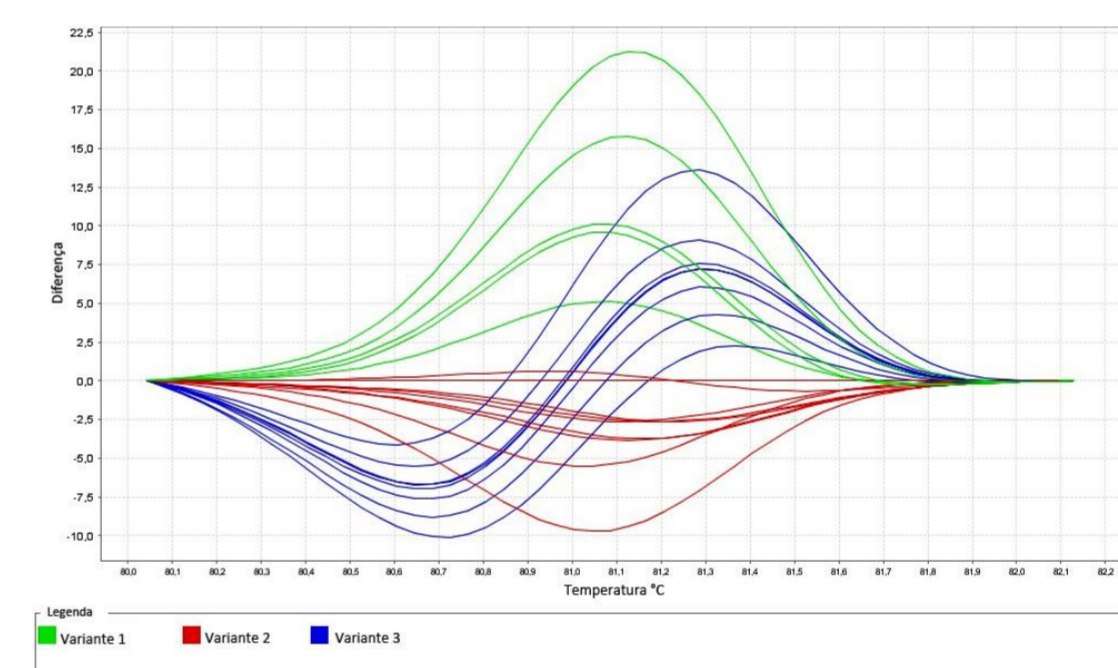


Figura 3. Análise por HRM de parte do éxon 13 do gene *CFTR*. As curvas em cores diferentes identificam variações de sequência de DNA distintas.

5. Discussão e Conclusões

A partir da análise por HRM das curvas de dissociação de DNA foi possível identificar alterações de sequência em todos os pacientes estudados para o éxon 14A do gene *CFTR*. O polimorfismo identificado (c.2562T>G) ocasiona uma alteração silenciosa no códon que codifica o aminoácido treonina. Dados publicados anteriormente mostram que a frequência dessa variação de sequência pode chegar a 30% em populações europeias⁴. Nessa amostra, a frequência do polimorfismo foi de 22,5% (9/40 alelos). Portanto, essa incidência parece adequada para indivíduos euro-descendentes.

Os resultados obtidos até o momento do éxon 13 do gene *CFTR* sugerem a presença de um polimorfismo entre os controles, além de pacientes com polimorfismos e/ou mutações. O sequenciamento das amostras para esse fragmento é indispensável para que se possa identificar as variações presentes e concluir a análise.

A metodologia empregada neste trabalho se mostrou eficaz para a triagem de variações de sequência de DNA nos fragmentos estudados e será, posteriormente, utilizada para analisar toda a região codificante do gene *CFTR*, visando a identificação do genótipo completo dos pacientes estudados.