

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA**

Análise da frequência do polimorfismo $(TG)_m-T_n$ no
gene *CFTR* em pacientes com Fibrose Cística
clássica e atípica.

Aluna: Laura Simon

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira

Julho de 2010.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, pela oportunidade e ensinamento durante a realização desse trabalho.

À minha família, por apoiar as minhas escolhas e compreender a minha ausência.

Aos meus amigos, que sempre participaram das minhas conquistas.

Aos colegas do Laboratório de Identificação Genética, pelo aprendizado, paciência e apoio.

Às professoras componentes da banca examinadora, pelo interesse e empenho.

Às Instituições que forneceram apoio financeiro: CNPq e FINE-PCPA.

Índice geral

Agradecimentos	2
Índice geral	3
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	4
Resumo	5
1. Introdução	6
1.1 Fibrose Cística	6
1.1.1. Fibrose Cística Atípica	6
1.2. Manifestações Clínicas	7
1.2.1. Função Pancreática Exócrina	7
1.2.2. Função Pulmonar	8
1.2.3. Glândulas Sudoríparas	8
1.2.4. Trato Genitourinário	9
1.2.5. Trato Gastrointestinal	10
1.2.6. Doença Hepatobiliar	10
1.3. O Gene <i>CFTR</i>	10
1.4. A Proteína CFTR	11
1.5. Mutações no gene <i>CFTR</i>	12
1.5.1. Classe I: Mutações que inibem ou diminuem a síntese proteica	13
1.5.2. Classe II: Mutações que afetam o processamento e transporte da proteína	14
1.5.3. Classe III: Mutações que afetam a regulação do canal de Cl ⁻	14
1.5.4. Classe IV: Mutações que afetam a condutância de Cl ⁻	15
1.6. Polimorfismo (TG) _m -T _n	15
1.7. Correlação Genótipo-Fenótipo	17
1.8. Diagnóstico	18
1.7.1. Diagnóstico Pré-sintomático	19
1.7.2. Diagnóstico Sintomático	19
1.9. Tratamento	21
2. Objetivos	23
3. Artigo	24
4. Discussão e Perspectivas	38
5. Referências Adicionais	40
6. Anexos	44

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

ABC	cassete de ligação a ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
AP-1	proteína ativadora 1 (<i>activator protein 1</i>)
ATP	adenosina trifosfato (<i>adenosine triphosphate</i>)
cAMP	adenosina monofosfato cíclica (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CBAVD	ausência bilateral congênita dos vasos deferentes (<i>congenital bilateral absence of the vas deferens</i>)
Cl ⁻	íon cloreto
CFTR	gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
FC	fibrose cística
IRT	tripsina imunorreativa (<i>immunoreactive trypsin</i>)
K ⁺	íon potássio
kb	quilobase
kDa	quilo Dalton
mmol/L	milimol por litro
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSD	domínio transmembrana (<i>membrane-spanning domain</i>)
Na ⁺	íon sódio
NBD	domínio de ligação de nucleotídeo (<i>nucleotide binding domain</i>)
pb	par(es) de base(s)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
SP1	fator de especificidade 1 (<i>specificity factor 1</i>)

Resumo

A Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, sendo causada por mutações no gene *CFTR*. A FC clássica se caracteriza pela presença de pelo menos uma mutação grave do gene *CFTR*, enquanto uma mutação branda em combinação com uma mutação grave ou outra mutação branda determinam casos de FC atípica. Além das mutações, genes modificadores e polimorfismos podem atuar parcialmente na penetrância fenotípica da doença. O polimorfismo $(TG)_m-T_n$, localizado no íntron 8, pode determinar a perda do éxon 9 durante a transcrição, resultando em uma proteína anormal. Três alelos comuns são conhecidos na região de politiminas (T_5 , T_7 e T_9), associados a repetições de 10 a 13 $(TG)_m$ localizadas imediatamente a jusante do locus T_n . Um número menor de timinas associado com longas repetições $(TG)_m$ aumenta a proporção de perda do éxon 9. O objetivo deste trabalho foi avaliar o polimorfismo $(TG)_m-T_n$ em 125 pacientes com diagnóstico clínico de FC clássica e 29 pacientes com diagnóstico clínico de FC atípica, provenientes do Serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O DNA dos pacientes foi extraído pela técnica de *salting-out* e quantificado por método fluorimétrico. A região polimórfica foi amplificada por PCR e submetida ao sequenciamento direto seguida por eletroforese capilar no analisador genético *ABI3130xl* (*Applied Biosystems*). Entre os pacientes com FC clássica, as frequências alélicas foram 0.008 para T_5 , 0.472 para T_7 e 0.520 para T_9 . No grupo de pacientes com FC atípica, foram observados apenas os alelos T_7 e T_9 , com frequências de 0.810 e 0.190, respectivamente. Nos grupos analisados, 10, 11 e 12 repetições TG foram observadas. Os alelos T_5 encontrados nessa estavam associados com 11 repetições TG. Esse estudo permitiu determinar a frequência do polimorfismo $(TG)_m-T_n$ em pacientes com FC clássica e atípica do sul do Brasil. Estudo semelhante deve ser realizado com a população normal da mesma região para a comparação das frequências em ambos os grupos e para a melhor compreensão do alelo T_5 na população normal e nos pacientes com FC.

1. Introdução

1.1. Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC, OMIM#219700) é uma das desordens autossômicas recessivas mais comuns em euro-descendentes (Strandvik *et al.*, 2001). A incidência varia de acordo com a etnia e é estimada em 1:2.500 em euro-descendentes, sendo a frequência de portadores de 1 a cada 25 pessoas; em afro-americanos 1:15.000; e em asiático-americanos 1:31.000 (Paranjape, 2008). Em estudo realizado em cinco estados brasileiros, a maior incidência foi observada no Rio Grande do Sul, estimada em 6,3 para 10.000 nascimentos (Raskin *et al.*, 2007). A doença é causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (*CFTR* – *cystic fibrosis conductance regulator*), que funciona como canal de cloreto regulado por cAMP na superfície apical da célula. O *CFTR* mantém a hidratação de secreções dentro das vias aéreas e dos dutos por meio da excreção de cloreto e da inibição de captação de sódio. Pelo menos uma mutação de perda de função em cada cópia do gene *CFTR* é necessária para o desenvolvimento da Fibrose Cística clássica, enquanto mutações que causam perda parcial da função em combinação com mutações de perda de função ou outras mutações de perda parcial de função são associadas com Fibrose Cística atípica (Groman *et al.*, 2005).

1.1.1. Fibrose Cística Atípica

Pacientes com FC clássica apresentam manifestações clínicas no pâncreas, trato respiratório, trato reprodutivo masculino e glândulas sudoríparas. Aproximadamente 10% dos pacientes com FC apresentam manifestações em apenas alguns dos órgãos citados. Esse fenótipo incompleto tem sido chamado de Fibrose Cística com suficiência pancreática, Fibrose Cística atípica e Fibrose Cística variante, com base no envolvimento do órgão (Groman *et al.*, 2005). A severidade da doença está correlacionada com a sensibilidade do órgão à disfunção do *CFTR* e à quantidade de proteína funcional, que é influenciada pelo tipo de mutação. Os casos de FC atípica incluem os pacientes que apresentam sintomas na adolescência ou na vida adulta, os pacientes com função pancreática exócrina normal e/ou concentração normal ou

limítrofe de cloreto no suor, ou ainda os pacientes com uma única característica clínica predominante (Paranjape *et al.*, 2008).

1.2. Manifestações clínicas

A forma clássica e mais comum da fibrose cística manifesta-se com doença obstrutiva pulmonar crônica, insuficiência pancreática exócrina, concentração elevada de cloreto no suor e infertilidade masculina devido a azoospermia obstrutiva. Ademais, o fenótipo da FC pode incluir sintomas ou complicações menos comuns como íleo meconial, síndrome obstrutiva do intestino distal, pancreatite, doença hepática ou diabetes (Zielenski, 2000). Muitos pacientes apresentam queixas respiratórias crônicas como rinite e sinusite e/ou pouco crescimento, resultado de uma combinação do aumento de gasto calórico decorrente de infecções pulmonares crônicas e da má nutrição causada por insuficiência pancreática exócrina.

As características podem estar presentes desde o nascimento ou surgir tardiamente. Geralmente, a FC é decorrente de duas mutações no gene *CFTR* que compromete o funcionamento da proteína, resultando em mudanças na constituição dos fluidos e eletrólitos na superfície celular e produzindo secreção anormal e resposta inflamatória. Dessa forma, as complicações predisõem a obstrução e infecção que resultam na patologia dos órgãos e estruturas tubulares adjacentes, como vias aéreas superiores e inferiores, pâncreas, intestino, *vas deferens* e fígado (Wallis *et al.*, 2003).

1.2.1. Função Pancreática Exócrina

Dos vários sintomas clínicos da FC, apenas a função pancreática pode ser correlacionada adequadamente com o genótipo (Rowntree e Harris, 2003). Cerca de 85% dos pacientes com FC apresentam função pancreática exócrina insuficiente (PI), enquanto o restante dos pacientes apresenta pâncreas exócrino anormal, mas funcionalmente suficiente (PS) (Welsh *et al.*, 2001). Análises moleculares das mutações de pacientes com diferentes fenótipos pancreáticos (PI e PS) revelaram duas categorias de alelos: grave e brando. O alelo grave confere insuficiência pancreática quando combinado com outro alelo grave, enquanto que o alelo brando garante a função

pancreática com caráter dominante, ou seja, mesmo na presença de um alelo grave (Zielenski, 2000).

A perda de transporte de cloreto por CFTR para o duto pancreático impede a hidratação de secreções e leva a retenção de enzimas exócrinas no pâncreas. Os danos causados por estas enzimas retidas podem causar fibrose do pâncreas.

1.2.2. Função Pulmonar

A severidade das complicações pulmonares nos pacientes com FC pode estar relacionada ao tipo de mutação no gene *CFTR*, assim como a fatores ambientais e imunológicos. A doença pulmonar obstrutiva progressiva é o principal determinante de morbidade e mortalidade entre os pacientes com FC, o que reitera a necessidade da identificação dos fatores envolvidos na progressão da doença (Schaedel *et al.*, 2002). A relação genótipo-fenótipo é mais clara em lactentes com FC que desenvolvem doença pulmonar, podendo-se prever a progressão da doença de acordo com as mutações apresentadas. Em estágios avançados da doença pulmonar há pouca ou nenhuma correlação, devido a influência dos fatores modificadores, como infecção com patógenos bacterianos (Zielenski, 2000).

As secreções desidratadas e viscosas nos pulmões dos pacientes com FC interferem na limpeza mucociliar, inibindo o funcionamento de peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural, criando um meio de crescimento para organismos patogênicos e obstruindo o fluxo de ar. As bactérias que colonizam as secreções liberam enzimas bacterianas iniciando uma reação inflamatória, levando a resposta do hospedeiro com liberação de citocinas inflamatórias e enzimas antibacterianas que danifica os bronquíolos. Os ciclos recorrentes de infecção, inflamação e destruição tissular diminuem a quantidade de tecido pulmonar funcional e, eventualmente, levam à insuficiência respiratória.

1.2.3. Glândulas sudoríparas

A alteração fisiológica mais consistente na FC tem sido as concentrações elevadas de Cl^- , Na^+ e K^+ no suor écrino. Essa anormalidade está presente desde o nascimento e se mantém ao longo da vida do paciente (Welsh *et al.*, 2001).

O CFTR controla a captação de sódio e cloreto do suor à medida que eles se movem pelo ducto sudorífero. Na ausência de CFTR funcional, o suor tem um conteúdo aumentado de cloreto de sódio, o que explica a aplicação do teste diagnóstico de cloreto no suor. A formação dos fluidos exócrinos inicia com a liberação de um fluido iso-osmótico pelos ácinos. A secreção passa pelos ductos e túbulos glandulares onde sofre reabsorção dos eletrólitos antes de ser excretada, o que não ocorre em pacientes com FC, devido a impermeabilidade dos dutos das glândulas sudoríferas (Taylor *et al.*, 2009).

As glândulas sudoríferas écrinas de pacientes com FC apresentam morfologia macroscópica e microscópica normais, assim como número adequado. Em contraste, as glândulas sudoríferas apócrinas apresentam-se mais dilatadas e preenchidas com secreções retidas, quando comparadas com glândulas de pacientes normais (Welsh *et al.*, 2001).

1.2.4. Trato Genitourinário

Aproximadamente 97% dos homens com FC são inférteis devido à azoospermia atribuída à ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD – *congenital bilateral absense of the vas deferens*) e a infertilidade pode ser a manifestação inicial para alguns homens com a forma intermediária da doença (Welsh *et al.*, 2001). Na maioria dos casos, a espermatogênese não está comprometida, porém as alterações obstrutivas não permitem que os espermatozoides cheguem à uretra (Moutou *et al.*, 2002).

Mulheres com FC são menos férteis do que mulheres normais, apresentando puberdade atrasada e amenorréia como consequência da doença sistêmica e má nutrição (Jarzabek *et al.*, 2004). A expressão do CFTR no trato reprodutivo feminino foi observada no cérvix, ovário, oviduto e útero. Apesar da função do CFTR nesses órgãos permanecer obscura, acredita-se na relação entre o controle do transporte de fluidos realizado pelo CFTR e sua contribuição para a infertilidade. Com a função prejudicada do CFTR diminui o fluxo de fluidos pelo epitélio cervical causando o acúmulo de muco e impedimento da passagem dos espermatozoides (Hodges *et al.*, 2008).

1.2.5. Trato Gastrointestinal

Pacientes com FC que apresentam insuficiência pancreática são predispostos à obstrução parcial ou incompleta do trato gastrointestinal, com manifestação precoce na forma de íleo meconial ou, mais tardiamente, como síndrome de obstrução intestinal distal. O íleo meconial está presente em 10 a 20% dos pacientes com FC e ocorre devido à dilatação e hiperplasia das glândulas submucosas ao longo do trato intestinal, associado com o acúmulo de secreções eosinofílicas no lúmen (Welsh *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2005).

1.2.6. Doença Hepatobiliar

A doença hepatobiliar na FC afeta primariamente os ductos biliares. A perda de efluxo de Cl⁻ leva a uma alteração na composição e na hidratação da bile, causando sedimentação de material eosinofílico nos ductos biliares com inflamação crônica secundária. Essas manifestações podem culminar em cirrose hepática (Welsh *et al.*, 2001).

A cirrose hepática é altamente associada com o estado pancreático do paciente e o desenvolvimento da doença hepática não parece ser associado com mutações específicas no gene *CFTR* (Cutting, 2005).

1.3. O Gene *CFTR*

O gene responsável pela FC foi identificado no braço longo do cromossomo 7 (7q.31) e subsequentemente isolado por clonagem posicional em 1989. O gene, denominado *CFTR*, compreende aproximadamente 190 kb de DNA genômico, dividido em 27 éxons, que é transcrito em um mRNA maduro de 6,5 kb (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). O gene *CFTR* apresenta um padrão de expressão fortemente regulado espacial e temporalmente. A investigação do padrão de expressão gênica do *CFTR*, realizada através da hibridização *in situ* de mRNA, mostrou altos níveis de expressão no epitélio dos dutos pancreáticos, no epitélio do intestino delgado e no epitélio pulmonar de fetos analisados. Em geral, o padrão fetal de expressão do *CFTR* se mantém na vida pós-natal, exceto no sistema respiratório, em que o nível de expressão tende a decrescer ao longo do desenvolvimento (McCarthy e Harris, 2005). A

análise da região promotora do gene revelou um alto conteúdo GC (65%), ausência de *TATA box*, presença de múltiplos sítios de início de transcrição e vários sítios potenciais de ligação das proteínas Sp1 e AP-1. Outros elementos encontrados nessa região foram elemento responsivo a cAMP (CRE – *cAMP response element*), sítio de ligação potencializador da ligação de proteínas CCAAT (C/EBP – *CCAAT-enhancer protein binding*) e vários elementos responsivos a glicocorticóides (McCarthy e Harris, 2005).

1.4. A Proteína CFTR

O produto traduzido do gene *CFTR* é uma proteína de 1480 aminoácidos e aproximadamente 168 kDa (Rowntree e Harris, 2003). A proteína CFTR é membro da superfamília dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), que inclui a proteína multidroga resistente (MDR) e os receptores de sulfuniluréia (SURs), por exemplo (Gadsby *et al.*, 2006). A estrutura da proteína é formada por dois domínios transmembrana (MSD), cada um com seis segmentos, dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBD) e um domínio regulatório citoplasmático (R), que apresenta vários sítios potenciais para fosforilação por proteínas cinases (figura 1). O CFTR funciona como um canal de cloreto dependente de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), que tem importante função no transporte de cloreto através da membrana apical de células epiteliais (Rowntree e Harris, 2003). A ligação do ATP aos domínios de ligação a nucleotídeo (NBD1 e NBD2) leva a dimerização dos domínios citoplasmáticos e abertura do canal proteico. A hidrólise de um dos ATPs leva a dissociação dos domínios NBD1-NBD2 e ao fechamento do canal. A fosforilação do domínio regulatório citoplasmático (R) por proteínas cinases é necessária para a transmissão do sinal ao portão que regula a abertura e fechamento do canal (Gadsby *et al.*, 2006).

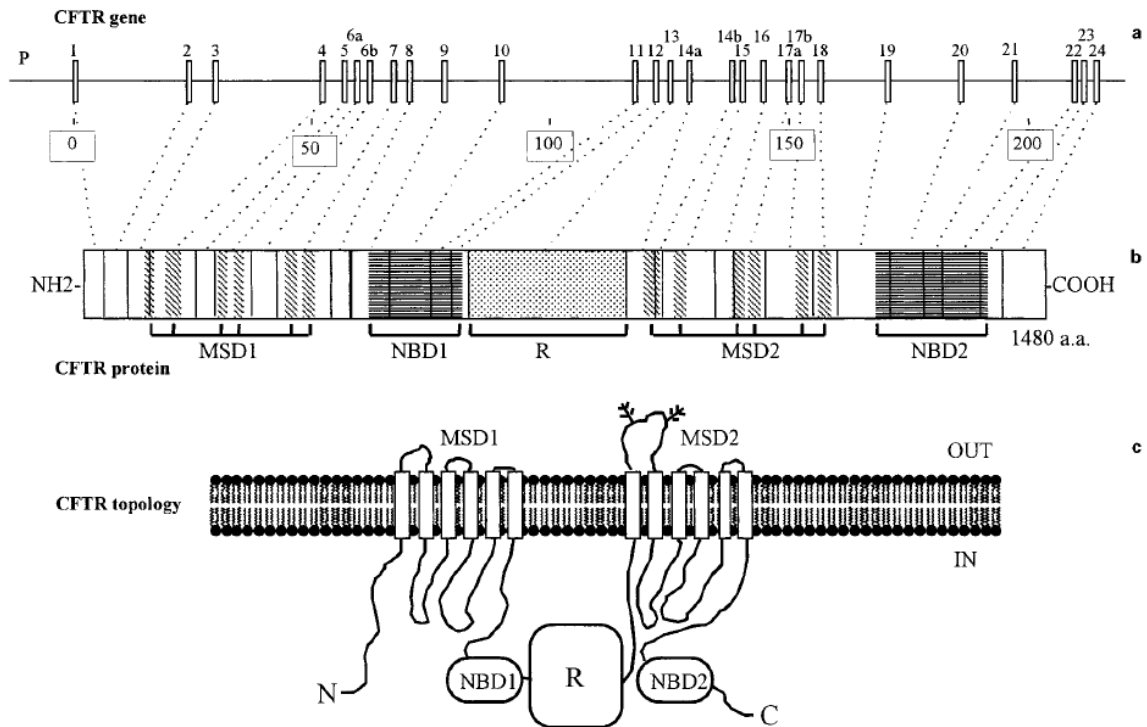


Figura 1. Diagrama esquemático do gene *CFTR*. **a)** Estrutura do gene *CFTR* apresentando a região promotora e 27 éxons. O tamanho dos íntrons é baseado nas sequências dos clones genômicos BAC 068P20 e 133K23 (submetidos ao GenBank pela Universidade de Washington). **b)** Polipeptídeo *CFTR* com os domínios preditos (regiões destacadas). **c)** Topologia da proteína *CFTR* relativa a membrana plasmática. MSD1 e MSD2 (*membrane spanning domain 1 e 2*) = domínios transmembrana; NBD1 e NBD2 (*nucleotide-binding domain 1 e 2*) = sítios de ligação de nucleotídeo; R (*regulatory domain*) = domínio regulatório (Adaptado de Zielenski, 2000).

1.5. Mutações no gene *CFTR*

Até o presente momento, mais de 1500 mutações e mais de 200 polimorfismos já foram identificados ao longo de todo o gene *CFTR*, incluindo a região promotora (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). No entanto, existem regiões do gene onde as mutações são mais comuns, como as que codificam os domínios NBDs e o domínio regulatório (R) (Rowntree e Harris, 2003). A primeira mutação, e também a mais frequente, identificada em euro-descendentes foi a deltaF508, uma deleção de 3 pb no

éxon 10 que causa a perda de uma fenilalanina na posição do aminoácido 508 da proteína (Zielenski, 2000). A mutação deltaF508 está presente em aproximadamente 70% dos alelos dos pacientes de FC. A maioria das outras mutações documentadas são muito raras, com apenas 4 mutações (G542X, N1303K, G551D e W1282X) apresentando frequência superior a 1% (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource/Table1.html>).

A ocorrência das mutações varia consideravelmente entre diferentes populações e localidades geográficas. A ocorrência da deltaF508 foi reportada com a menor incidência na Tunísia (17,9%) e a maior na Dinamarca (90%) (Rowntree e Harris, 2003). Em estudo realizado com pacientes do sul do Brasil, a frequência da mutação deltaF508 foi estabelecida em 48,7%, enquanto as mutações G542X, R334W, R553X e W1282X foram encontradas em 3,2, 1,3, 0,7 e 0,7% dos alelos, respectivamente (Streit *et al.*, 2003).

As mutações no *CFTR* têm sido classificadas em cinco grupos diferentes de acordo com o mecanismo pelo qual elas alteram a função do CFTR, entretanto, essas classes não são mutuamente exclusivas. As classes foram recentemente modificadas para incluir a antiga Classe V dentro da Classe I, já que todas essas mutações causam alteração no nível de mRNA funcional do *CFTR* (Rowntree e Harris, 2003).

1.5.1. Classe I: Mutações que inibem ou diminuem a síntese protéica

As mutações que pertencem a essa categoria são associadas com os fenótipos mais severos da FC, devido a ausência do produto protéico. Essas mutações inibem a síntese do produto estável ou produzem uma proteína truncada, resultado da formação de um códon de parada prematuro, sendo representantes as mutações G542X e R553X. Geralmente, as proteínas truncadas são instáveis e por isso são reconhecidas e degradadas por chaperonas no retículo endoplasmático (Rowntree e Harris, 2003). Mutações dessa classe também podem produzir fenótipos menos severos, que ocorrem devido a variações de sequências que alteram o padrão o *splicing*, produzindo uma pequena quantidade do transcrito do *CFTR* e baixo nível de proteína funcional que é translocada para a membrana. Um exemplo é o polimorfismo IVS8 na junção íntron 8 – éxon 9, em que podem existir as formas alélicas com 5, 7 e 9 timinas, sendo que a variante T₅ pode

afetar a gravidade do fenótipo quando associada em *cis* com uma mutação no *CFTR* (Welsh *et al.*, 2001). A mutação 3849 + 10kb C → T localizada no íntron 19 é outra variante que produz uma pequena quantidade de proteína funcional, que resulta em um fenótipo brando da doença (Rowntree e Harris, 2003).

1.5.2. Classe II: Mutações que afetam o processamento e transporte da proteína

As mutações da classe II resultam no processamento inadequado da proteína, que tem como consequência falha no transporte até a membrana e ausência da proteína funcional. A mutação deltaF508 é um exemplo desse grupo, em que ocorre a deleção de 3 pb na posição do aminoácido 508 dentro do domínio NBD1. Estudos *in vitro* mostraram que mutações dessa classe reduzem a eficiência do dobramento protéico, mas tem um pequeno efeito na estabilidade uma vez que a proteína é processada adequadamente (Qu *et al.*, 1997). A maioria das proteínas com falhas no processamento não pode ser transportada a partir do retículo endoplasmático e são marcadas com ubiquitina e consequentemente degradadas no proteossoma (Brodsky, 2001). No entanto, mesmo em pacientes homozigotos deltaF508 uma quantidade residual de CFTR pode ser liberado do retículo endoplasmático e alcançar a membrana plasmática. Outra mutação dessa classe, a P574H, apresenta um defeito de processamento bem menos severo que a deltaF508, e como resultado a proteína alcança o plasma e é funcional (Welsh *et al.*, 2001).

1.5.3. Classe III: Mutações que afetam a regulação do canal de Cl⁻

As mutações dessa classe afetam a regulação do *CFTR* pelo impedimento da ligação e hidrólise do ATP nos domínios de ligação à nucleotídeo NBD1 e NBD2, necessário para a ativação do canal. A proteína produzida é transportada para a membrana celular, mas não responde à estimulação por cAMP (Rowntree e Harris, 2003). As mutações G551S e G551D, por exemplo, foram identificadas dentro do domínio NBD1, que em condições normais interage com ATP intracelular, responsável por regular a abertura do canal de Cl⁻, e têm sido associadas a um fenótipo de FC menos severo (Welsh *et al.*, 2001).

1.5.4. Classe IV: Mutações que afetam a condução de Cl⁻

Muitas mutações foram identificadas nos domínios transmembrana de CFTR, em que o gene codifica uma proteína que é corretamente transportada para a membrana celular e recebe estímulos, mas gera um reduzido fluxo de íons de Cl⁻. Alguns exemplos de mutações de sentido trocado, como R117H, R334W, R347P, estão localizadas no domínio MSD1, que participa na formação do poro do canal (Zielenski, 2000). Na classe IV está incluída também a mutação D1152H no éxon 18 de *CFTR*, localizada na alça intracitoplasmática que conecta o domínio transmembrana MSD2 ao domínio de ligação a nucleotídeo NBD2, reduzindo significativamente o fluxo de Cl⁻ ativado por cAMP (Rowntree e Harris, 2003).

1.6. Correlação Genótipo-Fenótipo

O fenótipo em FC é altamente heterogêneo entre os pacientes, até mesmo entre irmãos que apresentam as mesmas mutações no *CFTR*. Isso indica claramente a contribuição de outros fatores, como loci genômicos alternativos contendo genes modificadores, e também a influencia de fatores ambientais na determinação da severidade da doença (Rowntree e Harris, 2003). As mutações consideradas ‘graves’ são aquelas em que se pode correlacionar a falta de CFTR funcional com insuficiência pancreática (>95% dos casos), doença hepatobiliar (subgrupo de 3 a 5% dos pacientes), diagnóstico nos primeiros anos de vida (geralmente < 1 ano de idade), alto nível de cloreto no suor (>80meq/l) e íleo meconial (~20% dos casos). Mutações ‘brandas’ que podem produzir uma quantidade restrita de CFTR funcional são frequentemente associadas com suficiência pancreática (70 a 80% dos casos), diagnóstico em idade avançada (geralmente >10 anos), baixo nível de cloreto no suor, ausência de íleo meconial e doença pulmonar leve (Rowntree e Harris, 2003).

Dos vários sintomas clínicos apresentados por pacientes com FC apenas a função pancreática tem uma correlação genótipo-fenótipo bem definida, sendo que mutações identificadas em pacientes com suficiência pancreática como R117H, R334W, R347P e A455E, têm efeitos mais sutis na função da proteína CFTR do que mutações observadas em pacientes com insuficiência pancreática (Cutting, 2005).

Embora a doença pulmonar seja altamente variável, já foi demonstrada a correlação entre certas mutações e a severidade da doença pulmonar. O *splicing* variante produzido pelo alelo T₅ no íntron 8 do gene *CFTR* foi associado com a penetrância parcial da doença. Uma correlação significativa entre o nível de transcrito normal de *CFTR* e a severidade da doença pulmonar foi encontrada no epitélio nasal. Pacientes com FC com função pulmonar normal ou doença pulmonar leve apresentam, em geral, mais de 25% do produto transcrito de *CFTR* normal. Ainda, a análise de pacientes com CBAVD mostrou a presença de 6 a 24% de produto normal transcrito, o que sugere que a variabilidade dos mecanismos de *splicing* desses pacientes com FC está associada com a penetrância variável da doença (Rowntree e Harris, 2003).

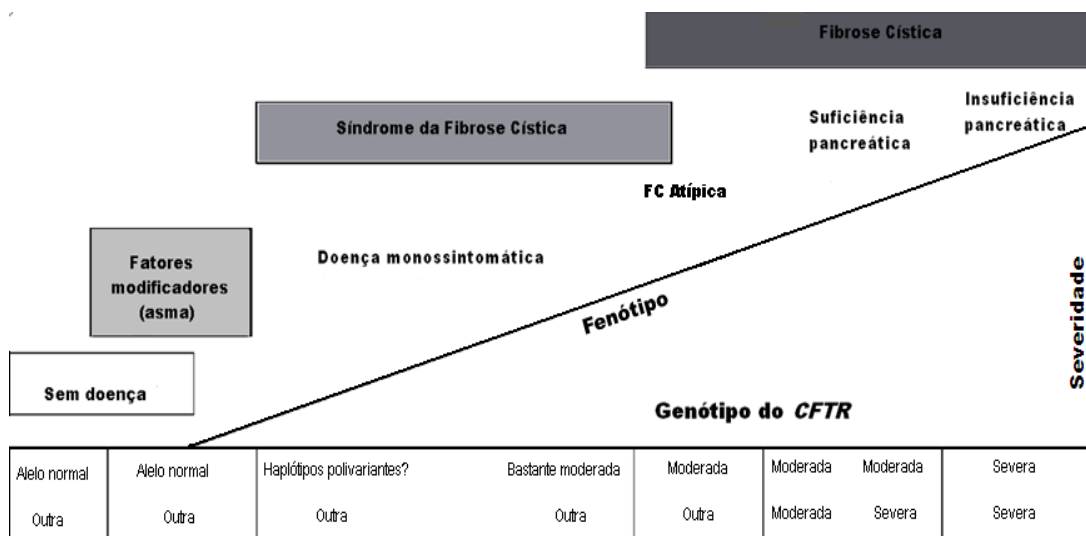


Figura 2. Espectro de fenótipos associados ao gene *CFTR*. A severidade dos fenótipos associados ao *CFTR* reflete o espectro subjacente de genótipos do *CFTR*. Há uma sobreposição entre a FC atípica e manifestações semelhantes a FC (síndrome da Fibrose Cística) em subgrupos de pacientes como doenças monossintomáticas como CBAVD e pancreatite idiopática. Alguns portadores de mutações no *CFTR* podem ter risco aumentado de manifestar certas condições pulmonares, como asma. Outra = mutações bastante moderadas, moderadas ou severas. Haplótipos variantes geralmente consistem em variantes polimórficas frequentes que podem contribuir para fenótipos monossintomáticos (Adaptado de Zielenski, 2000).

1.7. Diagnóstico

O critério para diagnóstico de um indivíduo para FC exige a presença de pelo menos uma característica fenotípica, assim como apresentar evidência laboratorial de disfunção no CFTR. Entre as características clínicas, podemos citar: (1) enfermidade pulmonar crônica, (2) insuficiência pulmonar, (3) anormalidades gastrointestinais e nutricionais, (4) azoospermia obstrutiva, ou (5) história familiar ou resultados positivos de triagem neonatal. E sobre as evidências de disfunção no CFTR, podemos listar: (1) níveis elevados de eletrólitos no suor, (2) identificação de mutações no gene CFTR ou (3) transporte anormal de íons no epitélio nasal (Rosenstein e Cutting, 1998).

O diagnóstico da FC clássica é mais fácil pelo envolvimento de múltiplos órgãos e confirmado pelo teste de suor positivo. Por outro lado, a FC atípica ainda representa um desafio para os clínicos, especialmente nos estágios iniciais da doença, devido a apresentação incomum e/ou aparecimento tardio dos sintomas (Alghisi *et al.*, 2008). Embora essa definição deva ser refinada no futuro, são designados como pacientes de FC Atípica aqueles que apresentam fenótipo de FC em pelo menos um órgão e apresentam valores normais (< 40 mmol/L) ou limítrofes (40 a 60 mmol/L) no teste de suor (Boyle, 2003). De acordo com o CFF (Cystic Fibrosis Foundation), aproximadamente 2% dos indivíduos cujos sintomas completam os critérios para o diagnóstico de FC demonstram FC atípica, o que se acredita ser um número subestimado e que um significativo número de indivíduos permanece sem diagnóstico (Boyle, 2003).

1.7.1. Diagnóstico Pré-sintomático

a) Testes de Triagem Neonatal

Os testes de triagem neonatal se baseiam na dosagem quantitativa da Tripsina Imunorreativa (IRT) e devem ser realizados na primeira semana de vida para apresentar maior valor diagnóstico. Os ácinos pancreáticos de crianças com FC são capazes de produzir tripsinogênio, precursor pancreático da tripsina, mas seus ductos pancreáticos estão bloqueados, impedindo que o tripsinogênio alcance o intestino e seja convertido em tripsina. É necessária confirmação do diagnóstico através de teste de suor e análise

de mutações no gene *CFTR*, porque há a possibilidade de falsos positivos e/ou negativos (Mishra *et al.*, 2005; Boeck *et al.*, 2006).

1.7.2. Diagnóstico Sintomático

a) Análise bioquímica

O teste de suor pelo método de iontoforese com pilocarpina é considerado o teste padrão ouro para confirmação do diagnóstico de FC. O procedimento envolve a coleta de suor estimulado por iontoforese por pilocarpina em papel filtro ou gaze, com posterior determinação química da concentração de Cl⁻ por colorimetria, coulometria ou por eletrodo íon-seletivo (Mishra *et al.*, 2005). Uma concentração de Cl⁻ superior a 60 mmol/L é consistente com o diagnóstico de FC. Valores de Cl⁻ entre 40 e 60 mmol/L são considerados intermediários (pode ser FC), enquanto valores <39 mmol/L são considerados negativos. Cada teste de suor deve ser repetido pelo menos duas vezes para cada paciente, de preferência com um intervalo de semanas entre os testes. Teste com valores positivos ou intermediários devem ser repetidos ou submetidos à análise molecular (Dalcin e Silva, 2008).

Embora a maioria dos pacientes com FC apresente elevadas concentrações de Cl⁻ no suor, existem muitos relatos de pacientes com sintomas clínicos sugestivos de FC, porém com valores de eletrólitos normais ou intermediários. Esses pacientes geralmente mantêm a suficiência pancreática, têm estado nutricional normal, ausência de vasos deferentes em homens e manifestação dos sintomas na idade adulta (FC não-clássica), necessitando ser submetidos a outros testes, como investigação genética, para o refinamento do diagnóstico (Mishra *et al.*, 2005).

Anormalidades no transporte de íons no epitélio respiratório de pacientes com FC estão associadas com padrão alterado da diferença de potencial nasal (*NPD – nasal potential difference*). Especialmente 3 características distinguem FC: (1) NPD basal elevado, (2) forte inibição do NPD após perfusão nasal com amilorida, e (3) nenhuma ou pequena mudança no NPD após perfusão do epitélio nasal com solução de isoproterenol sem cloreto. Um elevado NPD acompanhado de história familiar ou perfil clínico sugestivo da doença confirma o diagnóstico de FC. No entanto, a ausência de NPD aumentado não descarta o diagnóstico da doença, uma vez que resultados falso-

negativos podem ocorrer na presença de epitélio inflamado. Essa técnica diagnóstica está disponível apenas em centros altamente especializados e requer padronização rigorosa (Dalcin e Silva, 2008).

b) Análise Molecular

A análise das mutações relacionadas à FC tem valor diagnóstico, auxiliando na avaliação clínica e no prognóstico, identificando portadores de alelos para FC, além de ser útil na avaliação de pacientes com FC Atípica (Welsh *et al.*, 2001).

Mutações de perda de função de CFTR são associadas com FC Clássica, enquanto a FC Atípica está relacionada a uma combinação de mutações que causam perda parcial de função de CFTR e outros fatores (Welsh *et al.*, 2001). Um paciente com FC pode ser homozigoto (portador de uma mutação idêntica nos dois alelos CFTR) ou heterozigoto composto (com duas mutações diferentes em CFTR) (Boeck *et al.*, 2006). No entanto, a presença de apenas uma mutação ou nenhuma encontrada na análise molecular não descarta o diagnóstico de FC. Casos de FC Atípica em que nenhuma mutação foi encontrada já foram descritos (Groman *et al.*, 2005). Por isso, a existência de genótipos complexos, de fatores modificadores e de mutações atenuantes demanda a necessidade da consideração dos achados clínicos durante o processo de diagnóstico (Dalcin e Silva, 2008).

A análise das mutações apresenta alta especificidade para confirmação do diagnóstico de FC. Entretanto, sua sensibilidade é baixa, uma vez que existe um grande número de mutações (mais de 1000) que são conhecidas por causar FC e os ensaios comerciais disponíveis estudam apenas um número restrito dessas mutações. Poucos centros de referência têm acesso a painéis de triagem mais extensos ou podem realizar o sequenciamento completo do gene para diagnóstico de casos mais atípicos da doença (Dalcin e Silva, 2008).

1.8. Tratamento

As dificuldades em diagnosticar indivíduos com FC, principalmente os que apresentam fenótipo incompleto, levam ao atraso no desenvolvimento de terapias eficazes. Atualmente, o tratamento de FC é primeiramente direcionado para a prevenção

e/ou correção de disfunção em órgãos e alívio dos sintomas. A prevenção é feita através do monitoramento nutricional, gastrointestinal e do estado pulmonar, para permitir o crescimento e desenvolvimento normal de crianças portadoras da doença e melhorar a qualidade de vida na vida adulta (Welsh *et al.*, 2001).

A disfunção pulmonar é geralmente tratada com a retirada das secreções viscosas das vias aéreas. A administração de agentes mucolíticos, que diminuem a viscosidade do muco, e de broncodilatadores pode auxiliar na melhora da atividade pulmonar. Além disso, infecções crônicas endobronquiais, as quais são a maior causa de mortalidade em FC, são tratadas com antibióticos apropriados para o patógeno isolado das secreções do paciente. Casos mais graves, de indivíduos com insuficiência pulmonar, necessitam realizar transplante pulmonar bilateral. A insuficiência pancreática pode ser tratada com a suplementação de enzimas pancreáticas e controle da dieta, permitindo a melhora do crescimento em crianças (Welsh *et al.*, 2001).

O tratamento para os pacientes com FC atípica deve ser individualizado, sendo que regimes terapêuticos e protocolos desenvolvidos para indivíduos com FC clássica não devem ser aplicados (Wallis, 2003).

A FC parece ser um bom candidato para terapia gênica, visto que é uma doença monogênica com herança recessiva, com heterozigotos fenotipicamente normais (sugerindo que os efeitos da dosagem gênica não são críticos) e progressiva, com fenótipo praticamente normal ao nascimento, permitindo que metodologias terapêuticas tenham sucesso. Porém, apesar dos muitos avanços obtidos nessa área, a expressão de transgenes terapêuticos a níveis suficientes para resultar em correção fenotípica ainda não tem se mostrado eficiente (Lee *et al.*, 2005).

1.9. Polimorfismo (TG)_m-T_n

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que um alto número de repetições TG e um baixo número de timinas no locus (TG)_m-T_n induz a perda do éxon 9 no *splicing* (Cuppens *et al.*, 1998). O locus (TG)_m-T_n está localizado no íntron 8 próximo ao sítio acceptor de *splicing* do éxon 9. Três alelos comuns são conhecidos na região de politiminas: T₅, T₇ e T₉. Um menor número de timinas nessa região está associado com o aumento na frequência de perda do éxon 9 durante a transcrição do *CFTR* (tabela 1). O

produto transcrito do *CFTR* sem o éxon 9 resulta em uma proteína mal dobrada e não funcional, devido a perda de 21% da extremidade amino terminal da região NBD1 (Radpour *et al.*, 2007). Conseqüentemente, indivíduos que apresentam o alelo T₅ com alta frequência de perda do éxon 9 tem atividade reduzida do canal e podem ter suscetibilidade aumentada para doença pulmonar obstrutiva (Dahl *et al.*, 2005).

Tabela 1. Frequência de perda do éxon 9 no produto transcrito do *CFTR* em pacientes homocigotos para os alelos T₅, T₇ e T₉ (Adaptado de Dahl *et al.*, 2005).

T _n	Frequência de mRNA sem éxon 9
T ₅ /T ₅	66 a 90%
T ₇ /T ₇	12 a 25%
T ₉ /T ₉	1 a 13%

O alelo T₅ é encontrado em 5% da população normal e foi anteriormente associado com a penetrância parcial do fenótipo em FC. Uma maior frequência do alelo T₅ é encontrada em pacientes que apresentam doenças relacionadas a FC, como CBAVD, pancreatite idiopática ou crônica e doença sinopulmonar atípica (Pardoan, 2006). O alelo T₅ apresenta um efeito sinérgico quando em *cis* com a mutação R117H. Embora ambas as mutações, independentemente, sejam consideradas brandas, quando presentes no mesmo alelo resultam em um fenótipo severo, enquanto que indivíduos carregando R117H e T₅ em cromossomos separados (em *trans*) apresentam fenótipo de FC atípica (Pont-Kingdon *et al.*, 2004). O alelo T₅ está associado com 12 repetições TG em 91% dos pacientes adultos que sofrem de CBAVD ou FC Atípica quando em *trans* com mutações graves no *CFTR*, enquanto um número menor de repetições (TG)_m foi encontrado na maioria dos pacientes com FC Clássica (Pardoan *et al.*, 2006).

Além do locus T_n, outros elementos *cis*-atuantes podem interferir no *splicing* alternativo do éxon 9. Em específico, evidências recentes apontam outra sequência polimórfica, uma repetição de 10 a 13 (TG)_m localizada imediatamente adjacente do locus T_n. Estudos relatam que longas repetições (TG)_m, com TG₁₂ e TG₁₃, aumentam a proporção de perda do éxon 9 no produto transcrito, porém apenas quando ativados pelo alelo T₅, o que suporta a hipótese de que a repetição T_n é necessária para distanciar a

repetição (TG)_m do sítio 3' do *splicing* e que os diferentes alelos T_n afetam a eficiência de reconhecimento da sequência consenso acceptora de *splicing* (Radpour *et al.*, 2007).

Portanto, a determinação desses polimorfismos é importante para estabelecer a relação genótipo-fenótipo dos pacientes com FC, especialmente em casos de doença atípica.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo analisar a frequência das variantes polimórficas do locus $(TG)_m-T_n$ em pacientes com diagnóstico clínico de FC clássica e FC atípica.

3. Artigo

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de manuscrito, a ser submetido a revista *Molecular Genetics and Metabolism*.

Frequency of polymorphism (TG)_m-T_n in patients with classic and atypical cystic fibrosis

Laura Simon^a; Mariana Fitarelli-Kiehl^{a,b}; Hugo Bock^a; Paulo Dalcin^c; Fernando Abreu e Silva^c; Maria Luiza Saraiva-Pereira^{a,d,e}

^a Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^b Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^c Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Number of text pages: 9

Number of tables: 1

Number of figures: 2

Grant numbers and sources of support: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FIPE-HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Address to correspondence and reprint requests:

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3359-8011

Fax: +55 51 3359-8010

e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Cystic fibrosis (CF), which is among the most common life-shortening recessive illnesses, is caused by at least two mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. Severe mutations in each copy of the *CFTR* have been shown to cause classic CF, whereas mild mutations in combination with severe mutations or other mild mutations in the other *CFTR* have been associated with atypical CF. In addition to mutations that cause CF, modifier genes and polymorphisms can influence the phenotypic penetrance of CF. Variations in the polyvariant region (TG)_n-T_m in intron 8 of the *CFTR* gene can alter the splicing pattern of exon 9, resulting in abnormalities or decreased amounts of the functional CFTR protein. Three alleles, T₅, T₇, and T₉, have been identified with the intron 8 splice site associated with 10-13 TG repeats. The presence of these alleles in conjunction with a CFTR mutation - especially R117H - can influence CFTR expression and result in either a mild or atypical CF phenotype. In this work we genotyped the polyT tract of 125 classic CF and 29 atypical CF patients, previously diagnosed by the Pneumology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Patients presenting T₅ allele were also genotyped for R117H. Genomic DNA was extracted using the salting out technique and subsequently quantified by *Quant-iT*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) fluorimetric method. Samples were amplified by PCR, and purified products were analyzed by direct sequencing in the ABI 3130xl equipment (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). The T₅ allele was found in 2 patients (0.008) with classic CF and none of them presented with the R117H variant. T₇ and T₉ alleles were found at a frequency of 0.810 and 0.190 in atypical CF patients, and at a frequency of 0.472 and 0.500 in classic CF patients. TG tract presented 10, 11 and 12 repeats. The T₅ alleles were associated with 11 (TG).

Keywords: Cystic fibrosis, atypical CF, *CFTR* gene, (TG)_m-T_n polymorphism, South Brazil.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF OMIM#219700) is among the most common life-shortening recessive genetic diseases [1], and the incidence in Caucasians is estimated to be 1:2.500, with carrier frequency of approximately 1 in 25 [2]. CF results from mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene [3-6]. *CFTR* is a cAMP-dependent chloride channel and is known to be present in a variety of epithelial cells, including those in the lungs, the intestine, the pancreas, the salivary glands, the kidney, and the reproductive tract [7]. The degrees of organ involvement, and to some extent, disease severity correlate with the organ's sensitivity to *CFTR* dysfunction and to the amount of functional *CFTR*, which is influenced by the type of mutation [1]. The *CFTR* mutations are classified into four different groups, according to the mechanism by which they disrupt *CFTR* function [8]. Genotype-phenotype studies conducted especially with patients with variable pancreatic phenotypes revealed two categories of alleles: severe and mild. Mild alleles are associated with pancreatic sufficiency and milder presentations of CF, whereas severe alleles confer pancreatic insufficiency and other less common complications (MI, liver disease, diabetes) [9].

Patients with classic CF phenotype present chronic and recurrent sinopulmonary infections, steatorrhea, failure to thrive, pancreatic insufficiency (in approximately 85% of affected individuals) and elevated (>60 mEq/L) sweat chloride. Nonclassic phenotypes include individuals showing CF phenotype in at least one organ system with normal (<40 mEq/L) or borderline (40–60 mEq/L) sweat chloride values diagnosed in adolescence or adulthood. Severe mutations in each copy of the *CFTR* have been shown to cause classic CF, whereas mild mutations in combination with severe mutations or other mild mutations in the other *CFTR* have been associated with atypical CF [10].

More than 1500 mutations and over 200 polymorphisms have been described to date in the *CFTR* gene [11]. These polymorphisms do not cause CF, but may alter *CFTR* protein production and/or function. Such alterations may be clinically insignificant in individuals with no additional *CFTR* mutations, but have an influence on disease phenotype in patients with co-existing mutations [12]. Variations in the alleles of the polythymidine (polyT)

tract sequences in intron 8 of the *CFTR* gene can result in a reduced amount of full-length *CFTR* mRNA, and by extension, abnormalities, or decreased amounts of the mature, functional CFTR protein. Three alleles, T₅, T₇, and T₉, have been identified with the intron 8 splice site [1]. The different alleles at the (TG)_m-T_n polymorphic locus at the 3' end of human *CFTR* intron 8 determine the efficiency by which exon 9 is spliced. The resulting *CFTR* transcripts lacking exon 9 lose 21% of the amino terminal end of the NBF1 region and produce a protein that is misfolded and nonfunctional [13]. The T₉ allele is associated with the most preserved function of the intron 8 splice site, and this degree of preservation is reduced with the two short polyT (T₅ and T₇) alleles.

The presence of these alleles in conjunction with a *CFTR* mutation can influence CFTR expression and result in either a mild or atypical CF phenotype. For example, the mild mutation R117H/T₇ can result in congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and R117H/T₅ in atypical CF, whereas R117H/T₉ exhibits a normal phenotype. Differential splicing in tissues may in part be responsible for the lack of symptoms in other organs in men affected with CBAVD [1]. Individuals bearing a T₅ allele in *trans* with a severe CF-causing mutation may present with nonclassic CF or CBAVD, whereas about 40% may be healthy and fertile [14]. However, the T₅ allele alone can be responsible for disease, such as CBAVD. The T₅ allele has therefore been classified as a CBAVD disease mutation with partial penetrance [15].

Yet, there is growing evidence that the (TG)_m repeat preceding the T_n tract has a major impact on the clinical manifestation of the T₅ allele [14]. A recent study demonstrated that individuals with T₅ adjacent to either (TG)₁₂ or (TG)₁₃ repeats are substantially more likely to exhibit an atypical CF phenotype than those with T₅ adjacent to (TG)₁₁ repeats [16]. This finding is supported by studies proving a positive correlation between the length of the (TG)_m repeat and the proportion of exon 9 skipping [14].

The objective of this study was to analyze the frequency of the (TG)_m-T_n variants at intron 8 of the *CFTR* gene from patients with clinical findings of classic CF and atypical CF from South of Brazil by direct DNA sequencing.

2. Materials and methods

2.1 Sample characterization

We have studied 154 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). Patients were divided into two different groups as follows: 125 patients diagnosed in childhood with typical clinical features and abnormally elevated sweat electrolyte concentrations (>60 mEq/L), and 29 patients that were diagnosed after childhood with atypical clinical features with normal (<40 mEq/L) or borderline (40 – 60 mEq/L) sweat chloride values. The research protocol was approved by our local ethic committee.

2.2 DNA extraction

Blood sample (5mL) was collected in a tube EDTA-containing as an anticoagulant. Genomic DNA was isolated using the salting out technique, as previously described [17] and stored at -20°C . Subsequently, DNA was quantified by *Quant-iT*[®] fluorimetric method (*Invitrogen*, Carlsbad, CA). DNA samples were diluted to a concentration of 10 ng/ μL .

2.3 DNA Amplification

The *CFTR* exon 9 and flanking regions were amplified by PCR using specific oligonucleotide primers. For amplification of exon 9, primers were designed using Primer Express[®] Software v.3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). These sequences are CFS9F (forward) 5'-CCATGTGCTTTTCAAACATAATTGTACA-3' and CFS9R (reverse) 5'-CTCCAAAATACCTTCCAGCACTAC-3'. Samples containing the T₅ variant were also submitted to PCR amplification of exon 4 in order to analyze the presence of R117H variant. The general procedure and the specific nucleotide primers used for the amplification of exon 4 have been published previously [18]. PCR

was carried out in a total volume of 25 μ L containing 200 μ M of each dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 μ mol of each primer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), and 50 ng of DNA.

Amplification was performed in the Veriti[®] Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) with 10 minutes of initial denaturation at 94°C, then 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 59°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes. One-fifth of the PCR was analyzed by electrophoresis in an 1.5% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under UV light.

2.4 Direct DNA Sequencing

After PCR amplification, samples were purified using 2.5 U of Exonuclease I (USB Corporation, Cleveland, USA) and 0.25 U of Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Cleveland, USA) in a total volume of 7 μ L. Reactions were kept at 37°C for 30 minutes and enzymes were inactivated at 80°C for 15 minutes. Purified amplicons were sequenced with the BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) according to the manufacturer's recommendations. Sequencing products were purified by ethanol/EDTA precipitation, resuspended in formamide solution, and analyzed in the ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, USA) by Sequencing Analysis Software v.5.3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, USA). All identified sequence variants were confirmed from an independent DNA sample by sequencing with forward and reverse primers.

3. Results

We have identified all 308 alleles analyzed for the polymorphic region (TG)_m-T_n. Samples that have shown overlapping nucleotides were submitted to direct DNA sequencing from forward and reverse primers in order to identify each complex allele (figure 1). All complex alleles found in this study are shown in the table 1. In total, 14 different genotypes of the TG dinucleotide repeats and the polyT tract were observed in 154 CF patients.

Two (1.3%) patients were identified as T₅ allele carriers being both diagnosed as classic CF cases. These patients are heterozygous for this locus and present the complex alleles (TG)₁₁T₅/(TG)₁₁T₇ and (TG)₁₁T₅/(TG)₁₂T₇. Sequencing of *CFTR* exon 4 showed normal DNA sequence in the region of the R117H variant in these samples.

Among 250 alleles of 125 patients of classic CF, 126 (50.4%) carry (TG)₁₀T₉, 73 (29.2%) carry (TG)₁₁T₇, 37 (14.8%) carry (TG)₁₀T₇, 8 (3.2%) carry (TG)₁₂T₇, 4 (1.6%) carry (TG)₁₁T₉, and 2 (0.8%) carry (TG)₁₁T₅ variant. These results indicate the following allelic frequencies: 0.008 for T₅, 0.472 for T₇ and 0.520 for T₉ allele in this group.

Among 58 alleles of 29 patients of atypical CF, 27 (46.6%) carry (TG)₁₁T₇, 15 (25.9%) carry (TG)₁₀T₇, 10 (17.2%) carry (TG)₁₀T₉, 5 (8.6%) carry (TG)₁₂T₇, and 1 (1.7%) carry (TG)₁₁T₉ variant. The allelic frequencies in this group were 0.810 for T₇, and 0.190 for T₉ allele (figure 2).

4. Discussion

The association of polymorphic region $(TG)_m-T_n$ length in intron 8 of the *CFTR* gene and efficiency by which exon 9 is spliced have been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* by several studies [15]. Longer $(TG)_m$ tracts when activated by the T_5 allele increases the proportion of exon 9 skipping, with $TG_{13}T_5 > TG_{12}T_5$ [13]. Frequencies of alleles in euro-descendants were estimated to be 5% for T_5 allele, 84% for T_7 , and 11% for T_9 in the general population [19]. Among CF patients, the frequencies vary significantly according to the phenotype. The T_5 variant has been observed at high frequency in CBAVD patients (14.3%) [20] and in patients with chronic sinopulmonary disease (8%) [19].

In this study, we have established allelic frequencies of 0.6% for T_5 , 53.6% for T_7 and 45.8% for T_9 allele in our sample population that includes classical and atypical CF patients. A previous study performed in Brazilian CF patients demonstrates frequencies of 0.9% for T_5 alleles, 27.5% for T_7 alleles, and 71.6% for T_9 alleles [21]. Results of both studies can suggest that frequencies of these alleles can be different in Brazilian CF patients and/or that frequencies of these alleles in the general Brazilian population show a different distribution than data published previously for the North American population. Therefore, frequencies of these alleles have to be established in a non-CF Brazilian population in order to clarify this subject. We have also defined that patients with the T_5 allele in this specific cohort do not carry the R117H variant. This is another unexpected aspect generated by this study. It remains to be seen if this variant in our population is accompanied by a shorter allele in the polyT tract.

In summary, this study allowed the establishment of polymorphism $(TG)_m-T_n$ frequency in patients with classic and atypical cystic fibrosis from South Brazil. Similar study has to be carried out in a normal population from same region in order to compare frequencies in both cohorts and to provide a better comprehension of T_5 allele in normal and in CF patients.

References

- [1] S.M. Paranjape, P.L. Zeitlin: Atypical Cystic Fibrosis and CFTR-Related Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2008;35:116–123.
- [2] S. Raskin, L. Pereira-Ferrari, F.C. Reis, F. Abreu, P. Marostica, T. Rozov, J. Cardieri, N. Ludwig, L. Valentin, N.A. Rosario-Filho, E.C. Neto, E. Lewis, R. Giugliani, E.M.A. Diniz, L. Culpi, J.A. Phillip III, R. Chakraborty: Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2008;7:15–22.
- [3] B.S. Kerem, J.M. Rommens, J.A.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.I.C. Cox, A. Chakravati, M. Buchwald, L.-C. Tsui, Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science* 245 (1989) 1073–1080.
- [4] J.M. Rommens, M.C. Iannuzzi, B.-S. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.-C. Tsui, F.S. Collins, Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science* 245 (1989) 1059–1065.
- [5] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B.-S. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.-L. Chou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins, L.-C. Tsui, Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA, *Science* 245 (1989) 1066–1073.
- [6] M.J. Welsh, B.W. Ranzey, F. Accurso, G.R. Cutting, Cystic fibrosis, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, W.S. Sly (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eighth ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 5121–5173.
- [7] Y. Guo, M. Su, M.A. McNutt, J. Gu: Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2009;57(12):1113-1120.
- [8] R.K. Rowntree and A. Harris: The Phenotypic Consequences of *CFTR* Mutations. *Annals of Human Genetics* 2003;67:471–485.
- [9] J. Zielenski: Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* 2000;67:117–133.

- [10] J.D. Groman, B. Karczeski, M. Sheridan, T.E. Robinson, D. Fallin, G.R. Cutting: Phenotypic and genetic characterization of patients with features of “nonclassic” forms of cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 2005;146:675-680.
- [11] Cystic Fibrosis Mutation Database (2007) <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
- [12] J. Davies, E. Alton, U. Griesenbach: Cystic fibrosis modifier genes. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2005;45(98):47-54.
- [13] R. Radpour, H. Gourabi, M.A.S. Gilani, A.V. Dizaj: Molecular Study of (TG)_m(T)_n Polymorphisms in Iranian Males With Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *Journal of Andrology* 2007;28:541-547.
- [14] A. Schaller, T. von Känel, B. Gehr, J. Sanz, S. Gallati: Rapid and reliable genotyping of polymorphic loci modifying correct splicing of CFTR pre-mRNA using mass spectrometry. *European Journal of Human Genetics* 2007;15:53–61.
- [15] H. Cuppens, W. Lin, M. Jasper, B. Costes, H. Teng, A. Vankeerberghen, et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrana conductance regulator genes. The polymorphic (TG)_m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998; 101: 487-96.
- [16] J.D. Groman, T.W. Hefferon, T. Casals et al: Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004;74:176– 179.
- [17] A.S. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky: A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998, 16: 1215.
- [18] M.P. Audrezet, A. Dabricot, C. Le Marechal, C. Ferec: Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn* 2008, 10(5):424-434.
- [19] K.J. Friedman, R.A. Heim, M.A. Knowles, L.M. Silverman: 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. *Human Mutation* 1997;10:108-115.
- [20] E. Kanavakis, M. Tzetis, Th. Antoniadis, G. Pistofidis, S. Milligos, C. Kattamis: Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive

azoospermia or severe oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction* 1998;4:333-337.

[21] A.L.F. Bernardino, A. Ferri, M.R. Passos-Bueno, C.E.A. Kim, C.M.A. Nakaie, C.E.T. Gomes, N. Damaceno, M. Zatz: Molecular Analysis in Brazilian Cystic Fibrosis Patients Reveals Five Novel Mutations. *Genetic Testing* 2000;4:69-74.

Table 1. (TG)_m-T_n genotypes and frequencies of 154 CF patients.

Genotypes	Number	Frequency (%)
<i>Classic CF</i>		
(TG) ₁₀ T ₉ /(TG) ₁₀ T ₉	38	30.4
(TG) ₁₀ T ₉ /(TG) ₁₁ T ₇	30	24.0
(TG) ₁₀ T ₉ /(TG) ₁₀ T ₇	19	15.2
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₇	13	10.4
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₇	11	8.8
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	3	2.4
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₉	3	2.4
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	2	1.6
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₀ T ₇	2	1.6
(TG) ₁₂ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	1	0.8
(TG) ₁₁ T ₅ /(TG) ₁₁ T ₇	1	0.8
(TG) ₁₀ T ₉ /(TG) ₁₁ T ₉	1	0.8
(TG) ₁₁ T ₅ /(TG) ₁₂ T ₇	1	0.8
Total	125	100.0
<i>Atypical CF</i>		
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₇	10	34.50
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₇	5	17.24
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₀ T ₉	5	17.24
(TG) ₁₀ T ₉ /(TG) ₁₀ T ₉	2	6.90
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	2	6.90
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₉	1	3.45
(TG) ₁₂ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	1	3.45
(TG) ₁₁ T ₇ /(TG) ₁₂ T ₇	1	3.45
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₀ T ₇	1	3.45
(TG) ₁₀ T ₇ /(TG) ₁₁ T ₉	1	3.45
Total	29	100.00

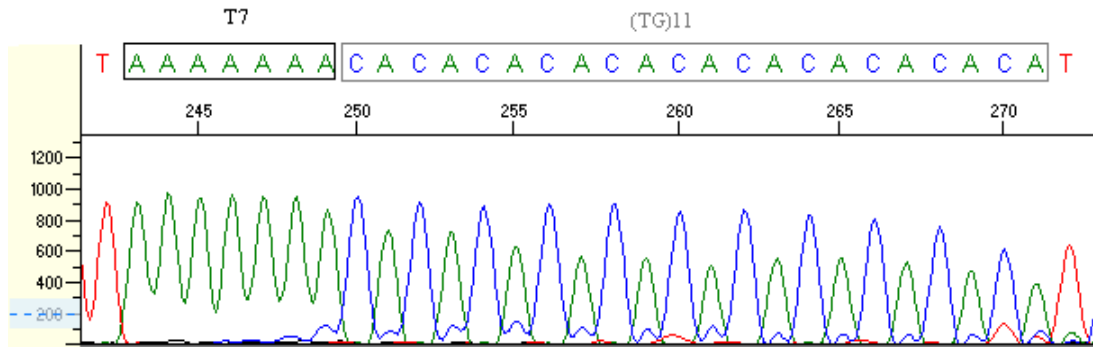


Figure 1. Direct DNA sequencing of exon 9 from a CF patient. Direct sequencing of *CFTR* exon 9 acceptor splice site from the reverse primer. The sequences circumscribed show the T₇ variant (in black) followed by (TG)₁₁ repeats (in gray).

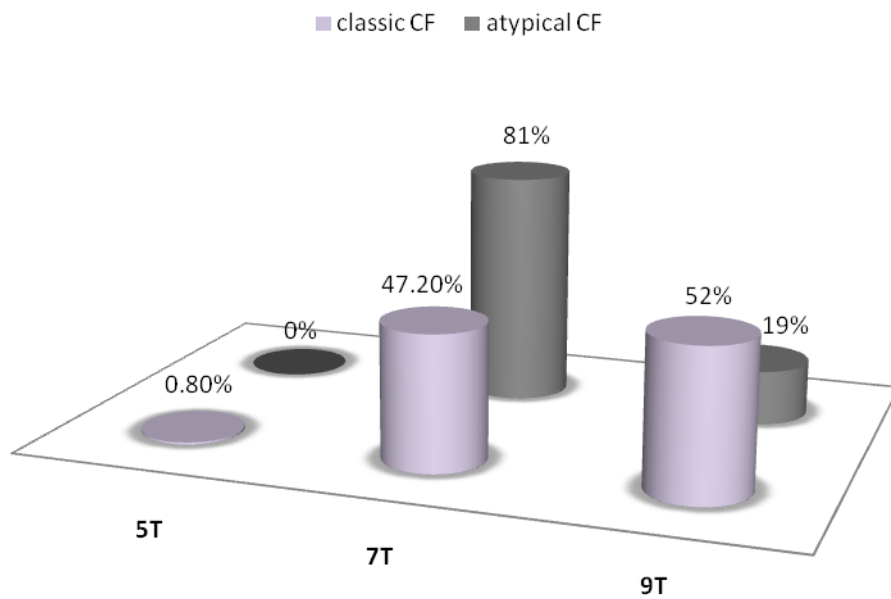


Figure 2. Frequency of poly-T variants in *CFTR* intron 8 in patients with classic and atypical CF.

4. Discussão e Perspectivas

As variantes polimórficas $(TG)_m-T_n$ encontradas no íntron 8 modificam o sítio acceptor de *splicing* do éxon 9 e podem determinar a perda do éxon durante a transcrição, resultando em uma proteína CFTR não funcional. A penetrância variável observada em pacientes que carregam o alelo T_5 ocorre porque diferentes quantidades de mRNA íntegro são necessárias para manter um mRNA ativo e sua função normal em nível basal em diferentes indivíduos, diferentes órgãos do mesmo indivíduo e em etapas distintas durante o ciclo celular. Embora o alelo T_5 seja encontrado em aproximadamente 5% dos alelos na população, ela representa, juntamente com a variante deltaF508, a sequência mais comum causadora de sintomas associados à FC no gene *CFTR* (Lebo e Grody, 2007).

Quando encontrado em *trans* (em cromossomo diferente) com uma mutação grave, o alelo T_5 pode determinar um fenótipo mais brando de FC. Por outro lado, quando encontrado em *cis* (no mesmo cromossomo) com a mutação R117H o efeito de ambas as modificações nucleotídicas torna-se mais severa (Lebo e Grody, 2007). Também foi observado que mutações graves em *trans* com o alelo T_5 associado com longas repetições TG estão presentes em mais de 90% dos pacientes com CBVAD ou FC atípica (Pardoan, 2006), mostrando a possível relação do locus $(TG)_m-T_n$ na determinação da severidade do fenótipo em FC.

Estudos descritos na literatura relatam que as frequências das variantes T_n entre grupos de indivíduos com FC são bastante variáveis. Um estudo realizado com pacientes brasileiros com FC do estado de São Paulo estabeleceu as frequências de 0.9% para o alelo T_5 , 27.5% para o alelo T_7 e 71.6% para o alelo T_9 (Bernardino *et al.*, 2000). Entre pacientes com CBAVD, a frequência do alelo T_5 é significativamente maior que a frequência encontrada em pacientes com FC clássica, e foi estimada em 27.4% em pacientes portugueses (Grangeia *et al.*, 2004).

Como citado anteriormente, neste trabalho foi possível identificar todos os alelos complexos $(TG)_m-T_n$ dos pacientes com FC clássica e atípica analisados. O alelo composto mais frequente entre pacientes com FC clássica encontrado em 50.4% dos alelos foi $(TG)_{10}T_9$, enquanto o alelo composto $(TG)_{11}T_7$ foi o mais frequente entre os

pacientes atípicos, representando 46.6% dos alelos analisados. Estudos anteriores mostram que pacientes que carregam a mutação deltaF508 geralmente apresentam o alelo T₉ (Ashavaid *et al.*, 2003). A correlação positiva entre a variante T₉ e fenótipos mais graves da FC poderia explicar a alta frequência do alelo entre o grupo de pacientes com fenótipo clássico da doença.

Futuramente, o quadro clínico dos pacientes que carregam o alelo T₅ assim como a presença de outras mutações no gene *CFTR* será avaliada com o objetivo de verificar a possível influência da variante nos fenótipos apresentados.

5. Referências Adicionais

Alghisi F, Angioni A, Tomaiuolo AC, D'Apice MR, Bella S, Novelli G, Lucidi V: Diagnosis of atypical CF: A case-report to reflect. *Journal of Cystic Fibrosis* 2008;7:292–294.

Ashavaid TF, Dherai AJ, Kondkar AA, Raghavan R, Udani SV, Udwadia ZF, Desai D: Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis in Indian Patients - A Preliminary Report. *JAPI*;51:345-348.

Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J and Sinaasappel M: Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61:627-635.

Boyle MP: Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related disease. *Lippincott Williams & Wilkins* 2003:498-503.

Brodsky JL: Chaperoning the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:39-42.

Cabello GMK, Cabello PH, Llerena CJ Jr, Fernandes O: Polymorphic Markers Suggest a Gene Flow of CFTR Gene from Sub-Saharan/Arabian and Mediterranean to Brazilian Population. *Journal of Heredity*, 2006;97(4):313–317.

Cutting GR: Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:237-260.

Cystic Fibrosis Foundation: Patient Registry 2001 Annual Report. Bethesda, Maryland 2002.

Dahl M, Hansen AT, Lange P, Nordestgaard BG: Asthma and COPD in cystic fibrosis intron-8 5T carriers. A population-based study. *Respiratory Research* 2005;6:113.

Dalcin PTR, Silva FAA: Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. *J Bras Pneumol.* 2008;34(2):107-117.

Gadsby DC, Vergani P, Csanády L: The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 2006;440:477-483.

Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A: A novel missense mutation P1290S at exon-20 of the CFTR gene in a Portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril.* 2005;83:448–451.

Grangeia A, Niel F, Carvalho F, Fernandes S, Ardalan A, Girodon E, Silva J, Ferrás L, Souza M, Barros A: Characterization of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly(T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens. *Human Reproduction* 2004;19:2502-2508.

Hodges CA, Palmert MR, Drumm ML: Infertility in Females with Cystic Fibrosis Is Multifactorial: Evidence from Mouse Models. *Endocrinology* 2008;149(6):2790-2797.

Jarzabek K, Zbucka M, Pepinski W, Szamatowicz J, Domitrz J, Janica J, Wolczynski S and Szamatowicz M: Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol* 2004;4(2):119-129.

Knowles MR, Durie PR. What is cystic fibrosis? *N Engl J Med* 2002;347:439-42.

Lebo RV, Grody WW: Variable Penetrance and Expressivity of the Splice Altering 5T Sequence in the Cystic Fibrosis Gene. *Genetic Testing* 2007;11:32-44.

Lee TWR, Matthews DA and Blair GE: Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J* 2005;387:1-15.

McCarthy VA, Harris A: The CFTR Gene and Regulation of Its Expression. *Pediatric Pulmonology* 2005;1-8.

Mishra A, Greaves R and Massie J: The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev* 2005;26:135-153.

Moutou C, Gardes N and Viville S: Multiplex PCR combining deltaF508 mutation and intragenic microsatellites of the CFTR gene for pre-implantation genetic diagnosis (PGD) of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2002;10:231-238.

Pardoan R, Corbetta C, Bassotti A, Seia M: Identification of the 5T-12TG allele of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in hypertrypsinaemic newborns. *Acta Pædiatrica*, 2006;95:871-873.

Pier GB, Grout M, Zaldi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB: Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 1996;271:63-67.

Pont-Kingdon G, Jama M, Miller C, Millson A, Lyon E: Long-Range (17.7 kb) Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Direct Haplotyping of R117H and IVS-8 Mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene. *JMD* 2004;6:264-270.

Rosenstein BJ and Cutting GR: The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 1998;132(4):589-595.

Schaedel C, Monestrol I, Hjelte L, Johannesson M, Kornfält R, Lindblad A, Strandvik B, Wahlgren L, Holmberg L: Predictors of Deterioration of Lung Function in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 2002;33:483-491.

Strandvik B, Björck E, Fallström M, Gronowitz E, Thountzouris J, Lindblad A, Markiewick D, Wahlström J, Tsui LC, Zielenski J: Spectrum of Mutations in the *CFTR* Gene of Patients with Classical and Atypical Forms of Cystic Fibrosis from Southwestern Sweden: Identification of 12 Novel Mutations. *Genetic Testing*, 2001;3(5):235-242.

Streit C, Neto ACB, Silva FA, Giugliani R, Pereira MLS: *CFTR* gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Molecular Genetics and Metabolism* 2003;78:259–264.

Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW: Physiological Measurements Confirming the Diagnosis of Cystic Fibrosis: the Sweat Test and Measurements of Transepithelial Potential Difference. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2009;10:220-226.

Wallis C: Atypical cystic fibrosis—diagnostic and management dilemmas. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2003;43(96):2-10.

6. Anexos

Instruções da revista Molecular Genetics and Metabolism para submissão de artigo

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Whenever **enzymes** are the subject of reporting, the Enzyme Commission (EC) number should be used for accurate identification and retrieval purposes. The Internet address for the Enzyme Commission is <http://www.bis.med.jhmi.edu/bio/search/FILT/enzyme.html>.

Genbank

DNA sequences and GenBank accession numbers. Whenever nucleic acid and/or protein sequence information is presented, an accession number from EMBL/GenBank or NBRF should be submitted. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold,

underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to the GenBank sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Human gene mutations should be named in accord with the recommendations of the Nomenclature Working Group (Antonarakis et al., Hum. Mutat. 11 (1998) 1-3; den Dunnen and Antonarakis, Hum. Mutat. 15 (2000) 7-12).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➔ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications

please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2000) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 1999, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

Additional information

Authors can suggest figures to the Editor for use as the *cover figure* for an issue. Cover figures should be in color and include data or a schematic model. There will be no charge to the authors for printing the color figure on the journal cover.