

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Análise molecular de mutações freqüentes em pacientes  
com suspeita clínica de Fibrose Cística**

Deise Cristine Friedrich

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora Profa Dra Maria Luiza Saraiva Pereira

Porto Alegre, março de 2007.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica e no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), PRONEX e FIPE-HCPA.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização desse projeto, tanto oferecendo o conhecimento necessário, quanto dando apoio e carinho nos momentos de dificuldades. Todas essas pessoas são especiais, cada uma de forma diferente, porém muito importantes para o término desta etapa. Então, gostaria de dizer muito obrigada a todos.

À minha orientadora Professora Dra Maria Luiza Saraiva Pereira pelo conhecimento, apoio, dedicação e paciência.

À minha família pelo apoio e carinho, pela liberdade de escolher meu caminho e por acreditarem no meu sonho.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica e no Laboratório de Identificação Genética do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela agradável convivência, principalmente aos colegas Hugo Bock e Thais Santa Rita pelo apoio técnico.

Às minhas queridas amigas e colegas de mestrado Priscilla Prestes, Carolina Franco, Vanessa Emmel, Fernanda Spies e Francine Marques pelo companheirismo, pelo carinho e por sempre terem uma palavra amiga.

Aos colegas de mestrado que tornaram as disciplinas mais divertidas.

Ao Elmo Cardoso, sempre prestativo nos momentos de dúvidas.

Ao pessoal do Serviço de Genética Médica do HCPA, principalmente a Zeniara e a Marilda.

Ao Serviço de Pneumologia do HCPA pela avaliação dos pacientes e dados fornecidos.

E, para finalizar, às fontes financiadoras pelos recursos cedidos a este projeto.

## SUMÁRIO

Instituições e fontes financiadoras	ii
Agradecimentos	iii
Sumário	iv
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1. Fibrose cística	1
1.1.1. Aspectos clínicos	2
a. Trato respiratório	3
b. Trato gastro-intestinal	5
c. Trato genital	6
d. Glândulas sudoríparas	6
1.1.2. Aspectos moleculares	7
a. O gene e a proteína	7
b. Expressão do gene	9
c. Mutações do gene	9
1.1.3. Fisiopatologia	13
1.1.4. Correlação fenótipo-genótipo	15
1.1.5. Genes modificadores na FC	18
1.1.6. Diagnóstico	19
a. Diagnóstico pós-natal	19
b. Triagem neonatal	21
1.1.7. Tratamento	22
1.2. Metodologias para o diagnóstico molecular	23
1.2.1. Seqüenciamento	23
1.2.2. Polimorfismo conformacional de fita simples	24
1.2.3. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação	24
1.2.4. Cromatografia líquida desnaturante de alta performance	25

1.2.5. Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição	25
1.2.6. Discriminação alélica por tamanho de fragmento	25
1.2.7. Oligonucleotídeos alelo-específicos	26
1.2.8. Sistema de mutação refratário à amplificação	26
1.2.9. PCR em tempo real	26
2. Objetivos	28
3. Artigo	29
4. Discussão	48
5. Conclusões	51
6. Referências	52
7. Anexos	57
7.1. Protocolo básico para as reações de amplificação por PCR em tempo real	58
7.2. Resultados do PCR em tempo real	59

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ARMS	sistema de mutação refratário à amplificação ( <i>amplification refractory mutation system</i> )
ASO	oligonucleotídeo alelo-específico ( <i>allele-specific oligonucleotide</i> )
ATP	adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
BSA	albumina de soro bovino ( <i>bovine serum albumin</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> )
CFTR	gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística ( <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
ddNTP	didesoxinucleosídeo trifosfato ( <i>dideoxynucleoside triphosphate</i> )
DGGE	eletroforese em gel com gradiente de desnaturação ( <i>denaturing gradient gel electrophoresis</i> )
dHPLC	cromatografia líquida desnaturante de alta performance ( <i>denaturing high performance liquid chromatography</i> )
DNA	ácido desoxirribonucléico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	desoxinucleosídeo trifosfato ( <i>deoxynucleoside triphosphate</i> )
ENaC	canal epitelial de sódio ( <i>epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> )
FC	fibrose cística
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ion bicarbonato
IRT	tripsina imunorreativa ( <i>immunoreactive trypsin</i> )
IP	insuficiência pancreática
kb	quilobases
kDa	quilo Daltons
mmol/L	milimolar por litro
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MSD	domínio de expansão de membrana ( <i>membrane-spanning domain</i> )
NBD	domínio de ligação de nucleotídeo ( <i>nucleotide binding domain</i> )
ng/mL	nanograma por mililitro

pb	par de base
PCR	reação de polimerização em cadeia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKA	proteína quinase dependente de cAMP ( <i>cAMP-dependent protein kinase</i> )
PKC	proteína quinase C ( <i>protein kinase C</i> )
R	domínio regulatório
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SP	suficiência pancreática
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples ( <i>single-stranded conformational polymorphism</i> )

## RESUMO

A fibrose cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, com uma incidência estimada em 1 caso em cada 2500 nascimentos. A fisiopatologia da FC reflete mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da FC, denominado CFTR. A patologia dessa doença envolve o trato respiratório, o trato gastro-intestinal, o trato gênito-urinário e as glândulas sudoríparas. A morbidade e mortalidade ocorrem devido às infecções persistentes e recorrentes das vias aéreas. O diagnóstico é baseado na presença de características clínicas e evidência de disfunção no gene CFTR. Mais de 1500 mutações nesse gene já foram identificadas, o que torna o diagnóstico molecular bastante difícil. Porém, a mutação  $\Delta F508$  apresenta alta frequência entre os euro-descendentes (66%). O objetivo deste trabalho foi implementar uma metodologia semi-automatizada para a detecção das mutações  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X e N1303K no gene CFTR utilizando PCR em tempo real através do sistema TaqMan® e aplicar a metodologia em uma população composta por pacientes que apresentam suspeita clínica de FC. A população foi composta por 190 pacientes e as frequências alélicas encontradas foram as seguintes: 50,0% para a mutação  $\Delta F508$ , 4,1% para a mutação G542X e 3,1% para a mutação N1303K. As mutações G551D e R553X não foram encontradas nessa amostra. Os genótipos encontrados foram: 14  $\Delta F508/\Delta F508$  (7,40%), 3  $\Delta F508/N1303K$  (1,60%), 2  $\Delta F508/G542X$  (1,05%), 1 G542X/G542X (0,50%), 27  $\Delta F508/?$  (14,20%), 2 N1303K/? (1,05%), enquanto 141 amostras (74,20%) não apresentaram as mutações estudadas. Dividindo a amostra em dois sub-grupos de acordo com a gravidade da suspeita clínica, no grupo com uma forte suspeita clínica, uma mutação foi identificada em 57,20% dos alelos (56/98) e os genótipos foram estabelecidos em 40,80% dos pacientes (20/49). Portanto, considerando os dois sub-grupos e suas respectivas frequências alélicas, demonstramos claramente que uma forte suspeita clínica é essencial para aumentar a identificação de alelos mutantes. Concluindo, o PCR em tempo real proposto usando sondas de hibridização foi eficaz e simples de ser utilizado na rotina laboratorial para detectar mutações no gene CFTR. Além disso, esse sistema é potencialmente adequado para programas de triagem neonatal e outros programas de larga escala.



## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in euro-descendants, with an estimated incidence in 1 case in each 2,500 births. CF physiopathology reflects mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, named CFTR. Pathology of this disease affects respiratory tract, gastro-intestinal tract, genital tract, and sweat glands. Mortality and morbidity occur due to recurrent and persistent airways infections. Diagnosis is based on presence of clinical symptoms and evidence of dysfunction in the CFTR gene. Up to date, more than 1,500 mutations were already identified in this gene. However,  $\Delta F508$  mutation shows high frequency among euro-descendants (66%). The aim of this work was to introduce a semi-automated methodology to detect  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X, and N1303K mutation in the CFTR gene using real time PCR through TaqMan® system, and to apply this methodology in a population composed by patients with a clinical suspicion of CF. Methodology was applied to 190 patients, and determined allelic frequencies were: 50.0% for  $\Delta F508$  mutation, 4.1% for G542X mutation, and 3.1% for N1303K mutation. G551D and R553X mutation were not detected in this sample population. Genotypes defined were: 14  $\Delta F508/\Delta F508$  (7.40%), 3  $\Delta F508/N1303K$  (1.60%), 2  $\Delta F508/G542X$  (1.05%), 1 G542X/G542X (0.50%), 27  $\Delta F508/?$  (14.20%), 2 N1303K/? (1.05%), while 141 samples (74.20%) did not present mutations studied. Dividing this population into two subsets according to the strength of clinical suspicion, within group with a strong clinical suspicion a mutation was identified in 57.20% of alleles (56/98), and genotypes were defined in 40.80% of patients (20/49). Therefore, considering both subsets and their allelic frequencies, we clearly demonstrate that a strong clinical suspicion is essential to increase the identification of mutant alleles. In summary, the proposed real time PCR using hybridization probes was efficient and simple to be applied in the laboratorial routine to detect mutations in the CFTR gene. In addition, this system is potentially adequate to neonatal screening and other large scale programs.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. FIBROSE CÍSTICA

A fibrose cística (FC, OMIM 219700) é a doença autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, com uma incidência estimada em 1 caso em cada 2.500 nascimentos. Portanto, a frequência de portadores é de 1 a cada 25 pessoas (Welsh *et al*, 2001). A incidência da FC em várias populações está resumida na tabela 1.1.

**Tabela 1.1. Incidência de FC em várias populações\*.**

País	Incidência
Euro-descendentes	
Austrália	1 em 2.450
Tchecoslováquia	1 em 2.600
França	1 em 1.800
Inglaterra	1 em 2.400
Alemanha	1 em 3.300
Israel	1 em 5.000
Itália	1 em 2.000
México	1 em 8.000 a 1 em 9.000
Irlanda do Norte	1 em 1.700
África do Sul	1 em 6.500
Suécia	1 em 7.700
Estados Unidos	1 em 1.900 a 1 em 3.700
Mestiços	
Ingleses-asiáticos	1 em 10.000
Americanos-africanos	1 em 15.000
Asiáticos	
Havaí	1 em 90.000
Japão	1 em 323.000

\*Adaptado de Welsh *et al*, 2001.

No Brasil, não existe nenhum estudo epidemiológico ou de triagem neonatal com a incidência da doença nas diversas regiões do país. Entretanto, a estimativa da incidência de FC no estado do Rio Grande do Sul é de 1:2.000 nascidos vivos (Abreu e Silva, comunicação pessoal).

A FC é uma desordem genética com características fisiopatológicas que refletem as mutações no gene CFTR (Knowles e Durie, 2002). O gene (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - CFTR*) responsável pela doença foi identificado e clonado em 1989 (Kerem *et al*, 1989; Riordan *et al*, 1989; Rommens *et al*, 1989).

A patologia dessa doença envolve o trato respiratório, o trato gastro-intestinal, o pâncreas, o trato gênito-urinário e as glândulas sudoríparas. Os órgãos e tecidos clinicamente envolvidos pela FC são todos compostos por epitélio, o qual apresenta transporte defeituoso de eletrólitos, particularmente o transporte de cloro, através da membrana apical. Infecções persistentes, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, ocasionam produção crônica de escarro, obstrução das vias respiratórias e, eventualmente, bronquiectasia e destruição do pulmão (Welsh *et al*, 2001).

### **1.1.1. ASPECTOS CLÍNICOS**

A apresentação clínica da FC é bastante heterogênea mostrando variabilidade na idade de diagnóstico e na gravidade da doença. A secreção inadequada de cloro e a excessiva reabsorção de sódio causam hidratação insuficiente do muco das vias aéreas e dos ductos pancreáticos (Welsh *et al*, 2001).

A ausência ou disfunção do canal de cloro CFTR leva ao desequilíbrio da homeostase de íon e fluído na superfície epitelial de uma variedade de tecidos ou órgãos (Li e Naren, 2005). Nas vias aéreas, o transporte defeituoso de eletrólitos altera o líquido superficial (muco). A patogênese da FC neste sistema é complexa, mas pode incluir atividade antimicrobiana do muco defeituosa, remoção mucociliar alterada, resposta inflamatória aumentada e outras anormalidades (Welsh *et al*, 2001).

A vulnerabilidade a infecções na FC ocorre somente nas vias aéreas e não em outros locais, tais como a pele ou trato urinário, então não há um defeito imune sistêmico na FC. Entretanto, ocorre inflamação excessiva em outros locais, como no intestino e no pâncreas,

onde é observada alta prevalência de doença inflamatória do intestino assim como altos índices de pancreatite (Chmiel e Davis, 2003).

Aproximadamente 10% dos pacientes com FC têm manifestações clínicas presentes em somente um dos órgãos (pâncreas, trato respiratório, trato reprodutivo masculino ou glândulas sudoríparas). Este fenótipo incompleto tem sido chamado de FC atípica (Hughes *et al*, 2001; Groman *et al*, 2005). Estes pacientes apresentam complicações conhecidas, tais como asma, bronquite crônica, pancreatite, ausência bilateral congênita dos vasos deferentes (CBAVD) com azoospermia (ausência completa de espermatozóides no sêmen) e pólipos nasais (Stern, 1997; Hughes *et al*, 2001). Infecção por *P. aeruginosa* é uma característica muito variável nestes pacientes (Groman *et al*, 2005).

Pacientes com FC atípica apresentam melhor estado nutricional, melhor sobrevivência, início tardio ou lenta progressão da doença pulmonar. A função das glândulas sudoríparas é anormal, mas não na extensão dos pacientes com FC clássica (Knowles e Durie, 2002).

#### **a. Trato respiratório**

Uma característica quase universal na FC é a pansinusite (inflamação que abrange a maioria dos seios paranasais), sendo esta incomum em crianças e adultos jovens normais. A presença desse sintoma sugere fortemente um diagnóstico de FC (Stern, 1997).

Bactérias, quando inaladas em pequenas quantidades, são removidas sem provocar significativa inflamação. Os pulmões de pacientes com FC não encaram esse desafio apropriadamente (Chmiel e Davis, 2003). Sendo assim, os pacientes fibrocísticos apresentam infecções pulmonares persistentes que causam prejuízo ao pulmão.

A infecção primária das vias aéreas é quase sempre causada por *S. aureus* e *Haemophilus influenzae*. A prevalência de infecção crônica com *P. aeruginosa* aumenta com a idade e é acompanhada pela diminuição na prevalência de *H. influenzae* e *S. aureus* (Heijerman, 2005; Mishra *et al*, 2005).

*P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa oportunista que produz substâncias imunomodulatórias que capacitam a sua sobrevivência no pulmão e causam significativa morbidade e mortalidade (Malfoot *et al*, 2005). Em hospedeiros normais, *P. aeruginosa* não é um patógeno, mas pode torna-se patogênico em indivíduos com as defesas

enfraquecidas. Essa bactéria, assim como outros patógenos envolvidos na FC, pode adquirir resistência a antibióticos (Chmiel e Davis, 2003).

Quando a colonização/infecção inicial com linhagens não mucóides e móveis de *P. aeruginosa* não é suficientemente tratada, a maioria dos pacientes torna-se cronicamente infectados pelas linhagens mucóides, que são imóveis (Heijerman, 2005; Malfroot *et al*, 2005). Estas linhagens ficam depositadas, imobilizadas, nas placas de muco da superfície das vias aéreas e exibem adaptações consistentes com a formação de biofilmes. As bactérias residindo em biofilmes são particularmente resistentes à atividade antimicrobiana endógena e exógena (Boucher, 2002). Mesmo com tratamento intensivo com antibióticos é quase impossível erradicar *P. aeruginosa* mucóide do trato respiratório inferior (Heijerman, 2005; Malfroot *et al*, 2005).

O número de pacientes colonizados por *Pseudomonas* é alto, como mostra um estudo no qual 76% estavam colonizados por esta bactéria e em 5,2% destes foi detectada a presença de *Burkholderia cepacia*, um fato preocupante porque a colonização por esta bactéria leva a um mau prognóstico, podendo diminuir a sobrevida desses pacientes em 10 anos. Em geral, a prevalência de *B. cepacia* varia de 5 a 15 % nos pacientes com FC (Avarez *et al*, 2004).

Os longos períodos de efeitos deletérios ocasionados pela resposta inflamatória, ao invés dos danos diretos das bactérias, são a principal causa da progressiva deterioração da função pulmonar existente na FC (Chmiel e Davis, 2003).

As infecções virais nos pacientes com FC promovem piora nos sintomas. Um patógeno viral é detectado em 13 a 52% dos pacientes que apresentam aumento nos sintomas do trato respiratório inferior. Os vírus mais comuns são: o vírus respiratório sincicial, principalmente em crianças; o *Influenza A e B*; o *Parainfluenza* e o adenovírus. O *Rhinovirus* é pouco descrito, provavelmente devido à dificuldade de diagnóstico. Outros agentes virais, como enterovírus, *Epstein Barr* e citomegalovírus, são menos frequentes (van Ewijk *et al*, 2005).

As infecções respiratórias virais ocorrem em frequências iguais entre fibrocísticos e pessoas saudáveis. Porém, pacientes com FC apresentam a função pulmonar diminuída, fazendo com que eles tenham sintomas exacerbados, necessitem de hospitalização e de uso prolongado de antibióticos. E, também, essas infecções virais causam aumento na morbidade respiratória, em longo prazo, em pacientes com FC (van Ewijk *et al*, 2005).

O fenótipo pulmonar pode ser bastante variável em pacientes com o mesmo genótipo. Essa variabilidade observada pode ser ocasionada, pelo menos em parte, por fatores ambientais juntamente com possíveis modificadores genéticos (Gracia *et al*, 2005).

## **b. Trato gastro-intestinal**

Em relação às manifestações gastro-intestinais, uma alta incidência (85%) de deficiência em ácidos graxos essenciais tem sido observada em pacientes com FC. A desnutrição crônica é associada com diminuição no peso e altura em crianças com FC (Peretti *et al*, 2005).

A insuficiência pancreática (IP) exócrina ocorre em aproximadamente 85% dos pacientes e é a única característica clínica bem relacionada com genótipo (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005). A deficiência de enzimas de secreção pancreática causa má absorção de gordura, esteatorréia (fezes volumosas, claras e fétidas) e baixo ganho de peso (Welsh *et al*, 2001). Os pacientes com suficiência pancreática (SP) caracterizam-se por um curso clínico mais suave, melhor estado nutricional, melhor função pulmonar e diagnóstico tardio (Lemos *et al*, 2004).

O tecido endócrino do pâncreas é preservado inicialmente, mas com o aumento da idade do paciente, células são perdidas e a glândula começa a ser completamente substituída por tecido fibroso e gordura. Quando o comprometimento atinge a porção endócrina do pâncreas, pode ocorrer intolerância a glicose e diabetes *mellitus*. A intolerância a glicose ocorre em 8 a 15% dos pacientes, podendo aumentar com a idade (Fiates *et al*, 2001).

A cirrose hepática é uma das complicações da FC. A doença hepática inicia em idade precoce, mas na infância é geralmente assintomática. As complicações, como cirrose e hipertensão porta, ocorrem com maior frequência nos adolescentes e adultos jovens. Embora a principal causa de morte entre os fibrocísticos continue sendo a insuficiência respiratória, as complicações decorrentes da hepatopatia contribuem para o aumento da morbidade desses pacientes (Fagundes *et al*, 2002).

Outra característica clínica da FC é o íleo meconial, que está associado à IP, podendo ser também resultante da presença de muco viscoso no intestino. Nesta condição, o mecônio contém uma grande quantidade de proteína e torna-se extremamente espesso,

causando obstrução do íleo terminal, que é responsável por aproximadamente 20% dos casos de obstrução intestinal durante o período neonatal (Oliveira *et al*, 2002). Bebês com íleo meconial deveriam ser sempre avaliados para FC porque poucas outras condições podem causar íleo meconial (Mishra *et al*, 2005).

### **c. Trato genital**

Quase todos os homens com FC são inférteis por uma malformação congênita do trato reprodutivo, apresentando ausência bilateral congênita dos vasos deferentes (Welsh *et al*, 2001).

Na população em geral, homens apresentando infertilidade por CBAVD, muito provavelmente apresentam uma mutação deletéria no gene CFTR (Anguiano *et al*, 1992).

As mulheres com FC são férteis, porém algumas apresentam o muco cervical anormal, o que pode contribuir para a infertilidade ([www.geneclinics.org](http://www.geneclinics.org)).

### **d. Glândulas sudoríparas**

Outra manifestação da doença é a excessiva perda de sais pelas glândulas sudoríparas. O paciente apresenta suor salgado, sendo esta característica a base para o diagnóstico pelo teste do suor. Este paciente pode ter depleção aguda de sais e alcalose metabólica crônica (Welsh *et al*, 2001).

As glândulas sudoríparas não apresentam nenhuma anormalidade histológica, porém apresentam anormalidade na homeostase sódio-cloro pela função do canal CFTR ser defeituosa. Os valores de cloro e de sódio no suor estão normalmente acima de 60 mmol/L nos pacientes com FC e podem chegar a 120 mmol/L. Estes valores, para pessoas normais, variam de 10 a 50 mmol/L (Mishra *et al*, 2005).

## 1.1.2. ASPECTOS MOLECULARES

### a. O gene e a proteína

O gene da FC, denominado gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (CFTR), está localizado no cromossomo 7, região q31-32. O gene CFTR é composto de 27 exons, englobando aproximadamente 250 Kb, o qual produz um transcrito maduro com 6,5 Kb. Este gene codifica uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, com peso molecular de 170 kDa (Kerem *et al*, 1989; Riordan *et al*, 1989; Rommens *et al*, 1989).

A proteína codificada pelo gene CFTR funciona como um canal direto na membrana epitelial que realiza o transporte do íon cloro através da membrana apical e o interior da célula e é regulado por cAMP (Welsh *et al*, 2001; Uzun *et al*, 2005).

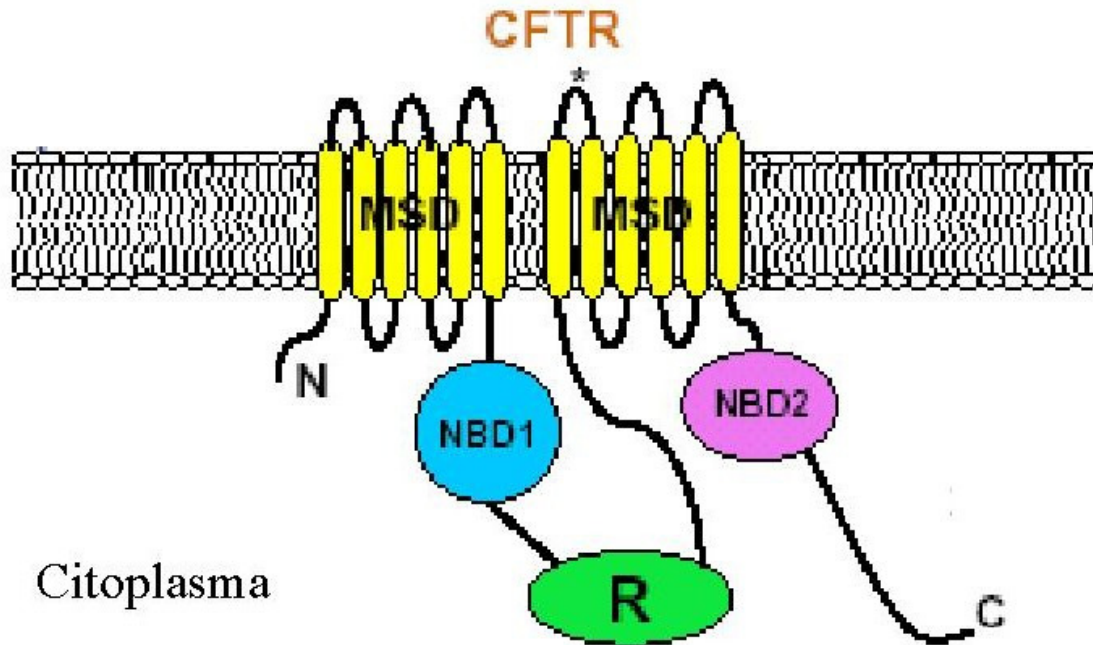
A proteína CFTR hidrolisa ATP e usa a energia liberada para direcionar o transporte de uma grande variedade de substratos através da membrana extra e intracelular (Morales *et al*, 1999; Li e Naren, 2005). A proteína CFTR é responsável pelo trânsito de drogas hidrofóbicas e de pequenos peptídeos, que incluem a proteína de resistência à multidroga. Essas características confirmam a hipótese de que esta proteína transporta uma substância que regula outros condutores, motivando seu nome (Morales *et al*, 1999).

O canal CFTR também age como um regulador de condutância, exercendo influências modulatórias sobre outros canais de íons (sódio e potássio), transporte de proteínas, e processos, tais como mecanismos de liberação de ATP, regulação da secreção de  $\text{HCO}_3^-$ , produção de óxido nítrico, entre outros (Welsh *et al*, 2001; Li e Naren, 2005).

O canal CFTR consiste de 2 motivos repetidos, cada um composto de um domínio hidrofóbico de expansão de membrana (MSD) contendo 6 hélices e uma região hidrofílica citosólica, que é o domínio de ligação de nucleotídeo (NBD), o qual pode ligar e hidrolisar ATP. Estes 2 motivos estão ligados por um domínio citoplasmático regulatório (R) (figura 1.1) rico em resíduos carregados e múltiplos sítios consenso para fosforilação pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA), pela proteína quinase C (PKC), entre outras. As caudas amino (N) e carboxi (C) terminal estão orientadas para o citoplasma e mediam a



interação entre o CFTR e a grande variedade de proteínas ligantes (Morales *et al*, 1999; Li e Naren, 2005).



**Figura 1.1. Ilustração esquemática da topologia do canal CFTR.** MSD = domínio de expansão de membrana, NBD = domínio de ligação de nucleotídeo, R = domínio regulatório, C = cauda carboxi terminal, N = cauda amino terminal. \* = sítio de glicosilação (Adaptado de Li e Naren, 2005).

O canal de cloro CFTR pode ser ativado através da fosforilação do domínio R por várias proteínas quinases e ligantes de ATP que é hidrolisado pelo domínio NBD (Li e Naren, 2005). A fosforilação pela PKA e pelas isoformas da proteína PKC e a hidrólise de ATP são necessárias para o canal tornar-se e manter-se ativo (Morales *et al*, 1999).

Durante a abertura normal do canal, ainda não está bem definido se ambos NBDs devem ligar ATP, se ambos hidrolisam ATP ou se uma combinação dos dois ocorre. A ligação de ATP no NBD1 tem um papel mais importante na abertura do canal que a hidrólise. No NBD2, tanto a ligação de ATP quanto a hidrólise contribuem para a abertura (Berger *et al*, 2005).

## **b. Expressão do gene**

A expressão do gene CFTR parece ser fortemente regulada e está confinada a certos tecidos, como o epitélio, onde ele tem especificidade de célula. Análises dos níveis de transcrito do CFTR durante o desenvolvimento revelam um distinto padrão temporal da expressão. Níveis de expressão de CFTR podem ser modulados por cAMP, PKA e PKC. Estas observações indicam que o gene tem um promotor sofisticado (Welsh *et al*, 2001).

Múltiplos sítios de iniciação da transcrição foram descritos para o gene CFTR. O uso destes sítios parece ser espécie e tecido-específico. A maioria dos sítios de iniciação da transcrição é encontrada dentro de uma região de 200 pb em torno do primeiro nucleotídeo do CFTR. O principal sítio de início ocorre cerca de 60 nucleotídeos a jusante do primeiro nucleotídeo putativo do CFTR. O início da transcrição no primeiro nucleotídeo representa uma minoria de sítios de início observado em linhagens celulares expressando altos níveis de mRNA CFTR (Welsh *et al*, 2001).

## **c. Mutações do gene**

Até o momento, mais de 1.500 mutações no gene CFTR foram identificadas pelos membros do Comitê Internacional de Análise Genética da Fibrose Cística (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Há regiões onde as mutações são mais comuns, tais como nos NBDs e no domínio R (Mishra *et al*, 2005). A grande maioria das mutações associadas à doença envolve um ou poucos nucleotídeos. Rearranjos genômicos representam apenas 1% das mutações, esses rearranjos são deleções ou inserções que afetam centenas ou milhares de pares de base. Substituições de aminoácidos representam 44% das mutações associadas à doença, enquanto mudança na fase de leitura (22%), no sítio de *splicing* (16%), mutações sem-sentido (14%) e deleções na fase (2%) compreendem as mutações remanescentes (Welsh *et al*, 2001).

As chamadas mutações raras compreendem 94% das mutações. A maioria é encontrada em somente um ou poucos indivíduos (Welsh *et al*, 2001).

As mutações são classificadas funcionalmente em 5 classes (figura 1.2):

- As mutações pertencentes à classe 1 incluem sinais prematuros de terminação e *splicing* anormal no gene, afetando gravemente a produção da proteína. A mutação mais

comum dessa classe é a G542X. Também estão incluídas nesta classe as mutações R553X e 621+1G>T (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005).

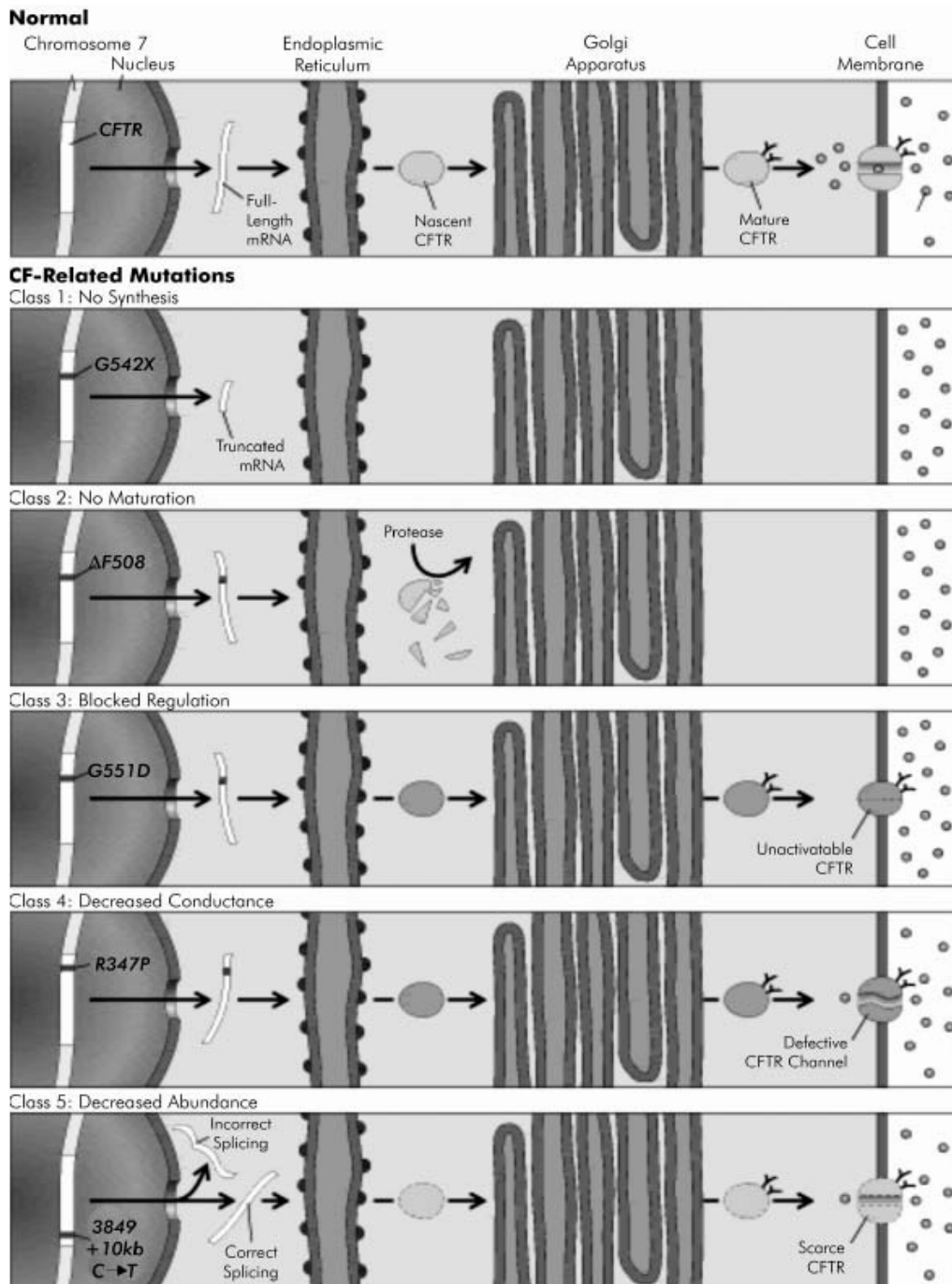
- As mutações pertencentes à classe 2 causam defeitos no processamento da proteína, com alteração na montagem e biossíntese da proteína. Essa proteína é degradada pela maquinaria de controle de qualidade da célula. Exemplos dessa classe é a mutação  $\Delta F508$ , que é a mais freqüente na FC e, também, as mutações N1303K e G85E (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005).

- As mutações pertencentes à classe 3 estão localizadas nos NBDs e geram regulação defeituosa do canal. As mutações dessa classe produzem uma proteína CFTR que é transportada para a membrana celular, mas não responde ao estímulo do cAMP. Exemplo dessa classe é a mutação G551D (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005).

- As mutações pertencentes à classe 4 estão localizadas nos MSDs. A proteína é corretamente sintetizada e transportada para a membrana celular e responde ao estímulo, mas a condutância de cloro é diminuída. Um exemplo é a mutação R117H (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005).

- As mutações pertencentes à classe 5 caracterizam-se pela redução na quantidade da proteína CFTR funcional em consequência da diminuição da quantidade de transcrito. Essas mutações podem ser troca de nucleotídeos na região codificante ou na região promotora e *splicing* anormal. Porém, uma pequena quantidade de mRNA completo é sintetizada, resultando em um fenótipo mais leve para o portador (Welsh *et al*, 2001; Mishra *et al*, 2005).

Entretanto, mutações individuais podem ter mais de um efeito e nem todos alelos tem uma classe funcional claramente definida (Welsh *et al*, 2001; Mckone *et al*, 2003).



**Figura 1.2: As cinco classes de mutações relacionadas ao gene da FC.** Numa condição normal (topo da figura), CFTR é transcrito em um mRNA, sofre a tradução, as modificações pós-traducionais e é transportado à membrana celular através do aparato de Golgi. Entre as mutações relacionadas com doença (painéis seguintes): mutações classe 1 impedem a tradução. Mutações classe 2 promovem o dobramento errôneo da proteína e a incapacidade de deixar o retículo endoplasmático, onde ela é degradada. Nas mutações classe 3 a proteína chega até a membrana celular mas não responde ao cAMP. Nas mutações classe 4 a proteína é transportada para a membrana e responde ao estímulo mas apresenta condutância diminuída. E, finalmente, as mutações classe 5 resultam em uma diminuição da quantidade de CFTR (Reproduzido de Mishra *et al*, 2005).

A mutação mais comum na FC, denominada  $\Delta F508$ , é uma deleção de 3 pb no exon 10 que codifica uma fenilalanina na posição 508 da proteína (Kerem *et al*, 1989). Esta mutação afeta a estrutura, a função e o dobramento do NBD1. A alteração na estrutura leva a retenção da proteína  $\Delta F508$ -CFTR no retículo endoplasmático, resultando em um nível drasticamente reduzido de proteína para atuar na membrana plasmática do epitélio exócrino em pacientes carregando a mutação  $\Delta F508$  (Morales *et al*, 1999).

A  $\Delta F508$  foi a primeira mutação a ser identificada e apresenta uma frequência de, aproximadamente, 66% em alelos de pacientes com FC nas populações euro-descendentes. Essa mutação é praticamente ausente em populações nativo-africanas e asiáticas. A frequência da mutação varia entre as populações européias com um aparente gradiente aumentando do sudeste para noroeste da Europa (30% na Turquia e Israel, 40 a 50% no sul da Itália, 70% no centro da Europa e 85% na Dinamarca) (Welsh *et al*, 2001).

No Brasil, a frequência da mutação  $\Delta F508$  varia de 22,7 a 48,7%, dependendo da região do país. Portanto, a frequência desta mutação no país é menor do que a frequência mundial (66%), sendo mais frequente na região sul, como demonstra a tabela 1.2.

**Tabela 1.2. Frequência da mutação  $\Delta F508$  em estudos realizados no Brasil.**

Número de alelos	Região do Brasil/estado	Frequência (%)	Referência
216	Sudeste/São Paulo	44,4	Okay <i>et al</i> , 2005
154	Sul/Rio Grande do Sul	48,7	Streit <i>et al</i> , 2003
66	Norte/Belém	22,7	Araújo <i>et al</i> , 2005
88	Sudeste/Rio de Janeiro	30,7	Cabello <i>et al</i> , 1999

Com exceção da mutação  $\Delta F508$ , todas as outras ocorrem em frequências baixas e em mais de 90% das mutações a frequência é menor do que 1%. As 10 mutações mais comuns do gene CFTR e suas frequências estão apresentadas na tabela 1.3.

Tabela 1.3. Mutações mais comuns do gene CFTR em euro-descendentes.\*

Mutações	Frequência relativa
ΔF508	66,0%
G542X	2,4%
G551D	1,6%
N1303K	1,3%
W1282X	1,2%
R553X	0,7%
621+1G>T	0,7%
1717-1G>A	0,6%
R117H	0,3%
R1162X	0,3%

\*Adaptado de [www.geneclinics.org](http://www.geneclinics.org)

### 1.1.3. FISIOPATOLOGIA

Uma das maiores características da inflamação na FC é a grande infiltração de neutrófilos no parênquima do pulmão. Estas células têm como produtos substâncias, particularmente elastase, que causam danos estruturais às vias aéreas, em longo prazo (Dinwiddie, 2005).

Há algumas hipóteses para a iniciação da inflamação e infecção na FC:

#### a) atividade antimicrobiana do muco defeituosa

As glândulas submucosas e o epitélio secretam numerosos peptídeos e proteínas antimicrobianas no muco. Estes peptídeos, por exemplo a defensina, fazem parte do sistema imune inato (Welsh *et al*, 2001). A defensina seria inativada pelo aumento da concentração de cloro no muco, em consequência da falta de CFTR (Terheggen-Lagro *et al*, 2005; Heijerman, 2005).

O prejuízo da atividade bactericida do muco poderia predispor às infecções repetidas das vias aéreas. Como resultado, macrófagos e neutrófilos são necessários para a remoção das

bactérias, iniciando a cascata inflamatória observada nas vias aéreas da FC (Welsh *et al*, 2001).

b) remoção mucociliar defeituosa

A remoção mucociliar diminui aumentando a gravidade da doença. Entretanto, não está claro se defeitos na remoção mucociliar tem um papel importante na patogênese do pulmão ou se ela é resultado da infecção e da inflamação (Welsh *et al*, 2001).

c) falha na remoção e/ou ligação aumentada de *P. aeruginosa*

Uma hipótese para a defesa específica das vias aéreas contra *P. aeruginosa* é que a proteína CFTR constitui um receptor específico para a internalização deste organismo. Se a proteína CFTR está faltando no epitélio das vias aéreas, então este receptor está ausente. Uma vez ligada ao canal CFTR, a bactéria *P. aeruginosa* é internalizada e a célula epitelial sofre apoptose, removendo a bactéria (Chmiel e Davis, 2003). Portanto, a proteína CFTR mutante demonstraria ligação reduzida com a *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, redução da remoção desta bactéria das vias aéreas em pacientes com FC (Heijerman, 2005).

Uma outra explicação para essa relação de *P. aeruginosa* e FC é que a proteína CFTR mutante pode aumentar a aderência bacteriana às células epiteliais dificultando a remoção (Heijerman, 2005).

Entretanto, estas hipóteses não explicam como pacientes com canais mutantes que estão presentes na superfície celular e pacientes que não possuem canais CFTR na superfície celular são igualmente vulneráveis à infecção por *P. aeruginosa* (Chmiel e Davis, 2003).

d) resposta inflamatória aumentada

O desbalanço de citocinas anti- (diminuídas) e pró-inflamatórias (aumentadas) resulta em inflamação excessiva e persistente das vias aéreas de pacientes com FC (Heijerman, 2005).

e) função anormal das glândulas submucosas

As glândulas submucosas produzem grande parte dos glicoconjugados que são importantes para a remoção mucociliar e elas secretam muitas substâncias antimicrobianas que protegem o pulmão. A composição macromolecular das secreções dessas glândulas pode ser anormal na FC (Welsh *et al*, 2001).

A função de canal de cloro da proteína CFTR isoladamente não explica toda a patologia da doença. Numerosas outras funções têm sido descritas que não se relacionam diretamente ao mecanismo da doença baseado em disfunção de canal, entre elas está a co-regulação do transporte de sódio através de um canal epitelial de sódio (ENaC) (Mishra *et al*, 2005).

O ENaC é expresso no epitélio alveolar e das vias áreas sendo responsável pela reabsorção de sódio (e água) do muco. A atividade do ENaC aumenta quando este canal não é inibido pelo canal CFTR, aumentando a reabsorção de sódio e água através do epitélio. O muco apresenta-se mais viscoso, em consequência ocorre diminuição da remoção mucociliar e estase desse muco que adere na superfície celular, não sendo removido pela tosse. As células ciliadas necessitam maior atividade metabólica para desempenhar sua função e, junto com o muco acumulado, levam a hipóxia nas placas de muco, o que promove o acúmulo de bactérias e a formação de biofilmes (Chmiel e Davis, 2003; Terheggen-Lagro *et al*, 2005).

#### **1.1.4. CORRELAÇÃO FENÓTIPO-GENÓTIPO**

O grande número de mutações no gene CFTR, juntamente com a ação dos genes modificadores, resultam em expressão variada no fenótipo da FC (Hughes *et al*, 2001). A determinação da correlação fenótipo-genótipo é muito difícil de ser realizada e poucas mutações apresentam manifestações definidas.

O fenótipo de pacientes portadores da mutação  $\Delta F508$  varia consideravelmente, mas esta mutação é frequentemente associada com doença grave (Morales *et al*, 1999). Considera-se fenótipo grave: diagnóstico precoce, IP, pobre estado nutricional, alta incidência de íleo meconial e altos níveis de cloro no suor (Keller *et al*, 2003). Para os



pacientes heterozigotos para  $\Delta F508$ , o fenótipo e a mortalidade são principalmente determinados pelo efeito do alelo não- $\Delta F508$ , ou seja, se o outro alelo é pertencente à classe 4 ou 5, que confere fenótipo mais leve, o prognóstico deste paciente será melhor (Mckone *et al*, 2003).

Além da  $\Delta F508$ , as mutações G551D e G1349D têm sido relacionadas com FC grave. As mutações A455E, P574H, R117H e G551S têm sido associadas com menor gravidade ou doença pulmonar branda e as funções do canal CFTR são menos comprometidas (Morales *et al*, 1999; Gracia *et al*, 2005). A mutação S1235R está altamente associada com bronquiectasia (Hughes *et al*, 2001).

A associação entre genótipo e íleo meconial na FC é incerta e geralmente ocorre em pacientes com IP, mas mesmo entre estes pacientes, é somente observado em 15% dos casos. O íleo meconial pode ser relacionado à mutações que causam fenótipo grave (Oliveira *et al*, 2002).

Um grande número de mutações já foi descrito em pacientes com CBAVD. Nestes, a mutação mais comum é a  $\Delta F508$  e a segunda mais comum é a R117H (Kámory *et al*, 2004; Uzun *et al*, 2005). Outras mutações, como a G542X, a G551D, a D1152H, a M470W, a R334W, a R74W, a M952I, a W1282X, a N1303K e a G85E são conhecidas por estarem envolvidas na etiologia de CBAVD (Wang *et al*, 2002).

Uma variação no comprimento de uma seqüência de politimidina (poliT) no sítio acceptor de *splicing* no intron 8 foi associada com eficiência variável do *splicing* do exon 9. Três variações no comprimento dessa seqüência são encontradas no intron 8, as variantes 5T, 7T e 9T. Somente a variante 5T, que promove a deleção do exon 9, é classificada como mutação e apresenta freqüência maior nos pacientes CBAVD, em relação as variantes 7T e 9T (Kámory *et al*, 2004).

A variante alélica 5T também aumenta a gravidade do fenótipo da mutação R117H (Hughes *et al*, 2001). Indivíduos heterozigotos compostos, apresentando o genótipo  $\Delta F508/R117H$ , são caracterizados por função pulmonar moderada, SP, eletrólitos no suor no limite ou aumentados e infertilidade masculina quando a mutação R117H está em *cis* com a variação 5T. Por outro lado, um alelo R117H em *cis* com a variação 7T determina apenas infertilidade masculina. A variante 9T ocorre quase exclusivamente em *cis* com a mutação  $\Delta F508$  (Friedman *et al*, 1997).

Uma sequência de repetições TG está presente no intron 8, imediatamente adjacente à região poliT. Estudos mostram que o número de repetições TG adjacentes ao alelo 5T correlaciona-se com deleção ou presença do exon 9 e essas repetições podem ser de 11, 12 ou 13 TG. A repetição TG11 em *cis* com a variante 5T é considerada benigna, sendo mais freqüente em indivíduos normais. As repetições TG12 e TG13 em *cis* com 5T são mais freqüentes em indivíduos afetados, ou seja, quanto maior a repetição TG maior é a penetrância do alelo 5T, aumentando a deleção do exon 9 (Groman *et al*, 2004).

Algumas mutações são associadas com teste de suor normal ou no limite da normalidade como, por exemplo, as mutações R177H, D1152H, A455E, G551S e 2789+5G>A. Entretanto, valores menores de cloro no suor são esperados para as mutações pertencentes às classes 4 e 5 (Mishra *et al*, 2005).

Pacientes com IP e SP têm diferentes alelos mutantes (Kerem *et al*, 1989). Dois alelos com mutações graves conferem IP e um alelo com mutação leve confere SP de uma forma dominante. Essa característica é descrita por um estudo no qual todos pacientes homocigotos para  $\Delta F508$  ou heterocigoto compostos ( $\Delta F508/*$ ) com a segunda mutação pertencendo às classes 1, 2 ou 3 apresentavam as funções dos ductos e ácinos pancreáticos severamente prejudicados. Entre os pacientes com a segunda mutação pertencendo a classe 4 ou 5, a função dos ácinos foi maior e abrangeu uma grande variedade de enzimas, em relação às outras classes (Ahmed *et al*, 2003).

Comparando as mutações pertencentes à classe 2 com as pertencentes às classes 4 e 5, os pacientes com mutações classe 4 apresentam idade de diagnóstico significativamente mais tardia, menores valores de íon cloreto no suor, melhor função pulmonar, melhor estado nutricional, menor taxa de colonização por *P. aeruginosa* e menor taxa de IP do que aqueles com mutações classe 2. Pacientes com mutações classe 5 também apresentam idade de diagnóstico significativamente mais tardia, melhor estado nutricional e menor taxa de IP do que pacientes classe 2. As taxas de mortalidade também são menores em pacientes com mutações classe 4 e 5 se comparadas com as taxas de pacientes com mutações classe 2 (Mckone *et al*, 2003).

### 1.1.5. GENES MODIFICADORES NA FC

Uma variabilidade fenotípica substancial pode ser observada entre pacientes que possuem a mesma classe de mutação no gene CFTR e, até mesmo, entre mutações idênticas, portanto fatores genéticos secundários podem modificar o fenótipo da FC. Estes fatores genéticos secundários, que modulam a gravidade da doença, são chamados de genes modificadores ou modificadores gênicos (Sliker *et al*, 2005).

Os chamados genes modificadores podem estar envolvidos em processos intracelulares onde o gene primário é expresso. Produtos dos genes modificadores podem afetar o *splicing*, a transcrição, a tradução, o transporte de proteínas, a glicosilação ou outros processos pós-traducionais, mas também, a expressão, a degradação e a secreção protéica (Sliker *et al*, 2005).

A expressão destes genes modificadores pode regular respostas como a inflamação, fibrose, defesa do hospedeiro, transporte de íon ou qualquer outra perturbação da homeostase existente na FC (Sliker *et al*, 2005).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) funcionais ocorrem nestes genes modificadores alterando o fenótipo da doença. Estes SNPs funcionais podem ser encontrados na região promotora de um gene modificador, afetando a taxa de transcrição; em um exon, afetando a estrutura ou função da proteína; ou dentro de um intron, interferindo no mecanismo de *splicing* (Sliker *et al*, 2005).

Os fenótipos pulmonares na FC podem ser modificados por genes associados com a remoção mucociliar, danos do tecido epitelial e seu reparo. Exemplos destes genes são: MBL (*manose-binding lectin*), NOS1 (*nitric oxide synthase 1*), HLA (*human leukocyte antigen gene*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ), GST (*gluthatione S-transferase*), ACE (*angiotensin 1 converting enzyme*), entre outros. Já os problemas gastro-intestinais podem ser influenciados por genes que modulam a proteólise e a fibrose, como o MBL, o HLA, o ACE, entre outros (Sliker *et al*, 2005).

## 1.1.6. DIAGNÓSTICO

### a. Diagnóstico pós-natal

O diagnóstico de FC é baseado na presença de, no mínimo, uma característica clínica e na evidência de disfunção do gene CFTR. Entre as características clínicas podemos citar,

- doença sinopulmonar crônica, incluindo colonização persistente e infecção das vias aéreas,
- anormalidades gastrointestinais, incluindo o íleo meconial,
- anormalidades nutricionais,
- insuficiência pancreática,
- retardo no desenvolvimento,
- síndrome da perda de sal pelas glândulas sudoríparas,
- história de FC em familiares,
- resultado positivo na triagem neonatal de um recém-nascido.

Entre as evidências de disfunção do gene CFTR, podemos citar:

- elevada concentração de cloro no suor detectada pelo teste do suor,
- identificação de mutações causadoras da doença FC em cada alelo CFTR,
- demonstração de transporte anormal de íons através do epitélio nasal.

O teste do suor para diagnóstico de FC foi padronizado em 1959 por Gibson e Cooke e é utilizado até os dias de hoje. A dosagem de eletrólitos no suor é realizada através do estímulo do suor pela iontoforese com pilocarpina (Avarez *et al*, 2004; Lemos *et al*, 2004).

Os valores de referência para o teste do suor são:

- menor do que 40 mmol/L = negativo
- entre 40 e 60 mmol/L = limítrofe
- maior do que 60 mmol/L = compatível com FC

A concentração de eletrólitos no suor aumenta com a idade e adultos saudáveis podem ter concentrações maiores do que 60 mmol/L (LeGrys, 1996).

O teste do suor é confiável para o diagnóstico em aproximadamente 98% dos pacientes com FC. Entretanto, pacientes com manifestações clínicas características de FC e

valores de eletrólitos no suor normais ou no limite da normalidade, ou seja, abaixo de 60 mmol/L, já foram descritos (LeGrys, 1996; Mishra *et al*, 2005).

Eventualmente, valores considerados normais para o teste de suor podem ser obtidos em pacientes fibrocísticos. Este fato foi demonstrado em um trabalho onde 10,6% dos 104 fibrocísticos estudados apresentavam a dosagem de cloro no suor menor que 60 mmol/L, sendo que 1,9% apresentou valores abaixo de 40 mmol/L, mostrando a importância do diagnóstico molecular (Filho *et al*, 2003; Avarez *et al*, 2004).

O teste do suor, assim como a dosagem da IRT, pode apresentar resultados falso-positivo e falso-negativo. Os resultados falso-positivos podem ser consequência de outras desordens que também aumentam a concentração de eletrólitos no suor; eczema; métodos que permitem que a amostra evapore e outros erros metodológicos e técnicos. Os resultados falso-negativos podem ocorrer se uma quantidade inadequada de suor é coletada e analisada e por causa de outros erros metodológicos e técnicos (LeGrys, 1996).

Várias desordens, além de FC, podem causar elevação nas concentrações de eletrólitos. Grande parte dessas desordens é distinguível clinicamente de FC como, por exemplo, anorexia nervosa, dermatite atópica, colestase familiar, deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, síndrome de Klinefelter, entre outras (LeGrys, 1996).

Para muitos pacientes com doença atípica, incluindo aqueles que tem o início dos sintomas mais tarde na infância ou quando adultos, o diagnóstico para FC torna-se mais complicado. Pacientes atípicos frequentemente não tem sintomas gastrointestinais característicos, podem não ter os sintomas pulmonares e a concentração de cloro no suor pode ser normal. Por isso, a identificação de mutações pode ser útil nestes pacientes (Stern, 1997; Welsh *et al*, 2001).

O diagnóstico molecular de FC não é fácil de ser estabelecido pelo grande número de mutações já descritas (mais de 1.500). Os laboratórios de países desenvolvidos que oferecem diagnóstico molecular para FC analisam um grande número de mutações, ou então sequenciam todo o gene, o que não é realidade em países como o Brasil, onde poucas mutações, muitas vezes somente a mutação  $\Delta F508$ , são pesquisadas.

## **b. Triagem neonatal**

O diagnóstico precoce, em recém-nascidos, é importante para a profilaxia das infecções pulmonares, para a reposição das enzimas pancreáticas, crescimento normal, diminuição das complicações resultantes da doença e para o aumento da sobrevida (Fiates *et al*, 2001; Welsh *et al*, 2001).

Para auxiliar no diagnóstico precoce, programas de triagem neonatal para FC identificam crianças com níveis elevados de tripsina imunorreativa (IRT) em recém-nascidos (Welsh *et al*, 2001).

A IRT é medida no sangue de recém-nascidos com o intuito de detectar precocemente manifestações bioquímicas da disfunção pancreática. A medição é feita em amostras de sangue seco (teste do pezinho) usando radioimunoensaio (Audrézet *et al*, 1993). A IRT é considerada alterada quando o valor é superior a 70 ng/mL.

Uma simples elevação de IRT logo após o nascimento não é específica para FC, visto que crianças normais podem apresentar uma elevação transiente nos níveis de IRT. Crianças com FC têm elevações persistentes de IRT e, portanto, os programas de triagem chamam as crianças para uma segunda dosagem, o que aumenta a especificidade da triagem (Welsh *et al*, 2001).

No caso de neonatos com altos níveis de IRT, testes genéticos são usados por muitos programas como um segundo passo para otimizar a especificidade e sensibilidade da triagem e um teste do suor (após 3 meses de idade) pode ser utilizado para confirmar o diagnóstico de FC (Welsh *et al*, 2001).

A dosagem de IRT tem suscitado muitas controvérsias devido às taxas de falso-positivos (0,5%) e falso-negativos (até 20%), além de ter a desvantagem de que a concentração do tripsinogênio começa a diminuir em poucas semanas após o nascimento, tornando-se um método de diagnóstico restrito aos dois primeiros meses de vida (Cabello *et al*, 2003).

O diagnóstico por triagem neonatal levaria à realização de sorologias de rotina, possibilitando a detecção precoce e a tentativa de erradicação mais eficiente da bactéria *P. aeruginosa*. Além disso, a triagem neonatal possibilitaria o aconselhamento genético dos pais antes da ocorrência de uma nova gravidez (Avarez *et al*, 2004).

### 1.1.7. TRATAMENTO

A FC apresenta melhora significativa com o tratamento sintomático. As terapias são direcionadas para a redução da obstrução, redução da inflamação ou da infecção dos pulmões (Zhang *et al.*, 2005). Administração de antibióticos, técnicas de limpeza das vias aéreas e antiinflamatórios são os principais tratamentos para a doença do pulmão (Welsh *et al.*, 2001).

Na terapia antiinflamatória são utilizados corticoesteróides orais, como a prednisona; corticoesteróides inaláveis, como o ibuprofeno; e antibióticos macrolídeos, como a azitromicina (Dinwiddie, 2005).

A intervenção nutricional na FC é de grande importância. Ela está associada com melhor crescimento e melhora ou estabilização da função pulmonar. Uma dieta rica em energia e gordura está associada a maior sobrevivência (Fiates *et al.*, 2001).

Ainda não se dispõem de um tratamento efetivo para a hepatopatia associada à FC. O tratamento preconizado é a utilização do ácido ursodesoxicólico (UDCA), que parece retardar a evolução da doença hepática e, para o controle da esteatorréia, é recomendada a utilização de lipase (Fagundes *et al.*, 2002).

Um protocolo padrão em vacinação antiviral e antibacteriana poderia melhorar a saúde dos pacientes FC, mas até o momento, não há nenhuma recomendação específica para imunização de crianças e adultos fibrocísticos, como há para outras doenças. É importante dizer que a FC não é uma contra-indicação para imunização rotineira, como tétano, difteria, poliomielite, sarampo, rubéola e caxumba. Além do mais, pacientes fibrocísticos são candidatos para vacinações extras, tais como influenza, hepatite, varicela, vírus respiratório sincicial e, talvez a mais importante, *Pseudomonas* (Malfrout *et al.*, 2005).

Muitos esforços para terapia gênica para a FC têm sido feitos, onde muitas técnicas estão sendo desenvolvidas como, por exemplo, a transferência gênica através de injeções no nariz ou diretamente na traquéia, ou ainda por intermédio de inalações. Ensaios pré-clínicos com camundongos e clínicos estão em andamento, porém a terapia gênica ainda não é um tratamento bem-sucedido (Griesenbach *et al.*, 2005).

## 1.2. METODOLOGIAS PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O diagnóstico molecular de doenças genéticas pode ser realizado por diversas metodologias laboratoriais que detectam mutações de ponto, pequenas ou grandes deleções e inserções nos genes, rearranjos gênicos e genômicos. As mutações presentes no gene CFTR podem ser detectadas através de metodologias como a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO), sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS-PCR), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC), seqüenciamento e, mais recentemente, sistemas de PCR em tempo real usando *SybrGreen* ou sondas para hibridização (Dempsey *et al*, 2004).

Algumas metodologias baseadas em PCR que podem ser empregadas no diagnóstico molecular estão brevemente descritas a seguir.

### 1.2.1. Seqüenciamento (método de Sanger)

A reação de seqüenciamento é uma reação de alongamento da cadeia de DNA a partir de um *primer* e na presença de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTPs), didesoxinucleosídeos trifosfatados (ddNTPs) e DNA-polimerase. Os ddNTPs não apresentam a hidroxila no carbono 3', de forma que, uma vez incorporados, impedem a adição de outro nucleotídeo, terminando o alongamento da cadeia (Borges-Osório e Robinson, 2001).

Quatro reações são realizadas, cada uma correspondente a um ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP). Após as reações, as amostras são desnaturadas na presença de formamida, separadas por eletroforese e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante quando os ddNTPs são marcados radioativamente. Atualmente, utiliza-se *primers* ou nucleotídeos marcados por substâncias fluorescentes que são visualizadas por um sistema de detecção a *laser*, através da eletroforese capilar (Borges-Osório e Robinson, 2001).

O seqüenciamento direto pode ser empregado para detectar qualquer alteração do genoma, sendo utilizado como meio de varredura de mutações. Entretanto, o seqüenciamento é uma metodologia trabalhosa e demorada, sendo bastante dispendiosa se



for utilizada para analisar vários exons de um gene numa amostra de DNA genômico (Strachan e Read, 2002).

Essa metodologia é empregada com maior frequência em trabalhos de pesquisa e na confirmação de uma mutação depois da utilização de outro sistema que detectou a presença de uma alteração.

### **1.2.2. Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)**

Esta técnica tem como princípio a eletroforese em um gel de poliacrilamida não-desnaturante para detectar alterações na conformação da fita simples quando esta forma *heteroduplex* ao longo da corrida, visto que a seqüência de bases determina a conformação tridimensional e a taxa de migração. O produto de PCR é desnaturado e submetido à eletroforese no gel de poliacrilamida não-desnaturante (Férec *et al*, 2004, <http://www.ghente.org>). A sensibilidade desta técnica é limitada e não revela a natureza nem a posição da alteração detectada. Desta forma, essa metodologia é utilizada como triagem inicial, sendo essencial a realização de outra técnica para confirmar a alteração encontrada.

### **1.2.3. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)**

DGGE consiste de uma eletroforese em gel desnaturante no qual os produtos de PCR começam a desnaturar a partir de um determinado ponto da corrida dependendo da sua seqüência de nucleotídeos, visto que o gel apresenta um gradiente de desnaturação e apresenta temperatura controlada. O retardo na migração permite a diferenciação de alelos com pequenas diferenças na seqüência (<http://www.ghente.org>). Os géis de DGGE bidimensionais apresentam quase 100% de sensibilidade na detecção de mutações, porém não revelam a posição da mudança (Strachan e Read, 2002). Nesse caso, novamente é necessário o uso de uma outra metodologia para confirmar a alteração.

#### **1.2.4. Cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC)**

A técnica de dHPLC é muito eficaz e sensível para o rastreamento de mutações de ponto e polimorfismos. Nesta técnica, os produtos de PCR são submetidos à cromatografia líquida de fase reversa em uma coluna contendo partículas não-porosas alquiladas. Dentro de um gradiente e sob desnaturação parcial por calor, *heteroduplexes* que podem estar presentes em um produto de PCR apresentam um tempo de retenção na coluna reduzido em relação ao *homoduplexes* selvagem. Os padrões desses *heteroduplexes* são facilmente detectados e qualquer alteração no genoma pode ser identificada (Férec *et al*, 2004). Esse método também se enquadra na categoria de metodologias de triagem, sendo aconselhável a utilização de outra metodologia para melhor identificação e caracterização da alteração genômica.

#### **1.2.5. Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)**

Polimorfismos podem ser detectados com base em diferenças no comprimento de fragmentos de DNA produzidos pela clivagem com enzimas de restrição, que cortam o DNA em seqüências específicas reconhecidas por essas enzimas. Esta técnica, denominada de RFLP, detecta a criação ou a retirada, pelas mutações, de sítios de clivagem reconhecidos por enzimas de restrição, o que torna possível a diferenciação entre alelos normais e mutantes. O RFLP pode ser analisado em gel de agarose ou de poliacrilamida. (Borges-Osório e Robinson, 2001; <http://www.ghente.org>).

#### **1.2.6. Discriminação alélica por tamanho do fragmento**

Pequenas inserções e deleções podem ser facilmente detectadas pelo planejamento de *primers* a partir de regiões flaqueadoras próximas ao sítio da mutação e pela discriminação dos alelos normal e mutante pelo tamanho dos fragmentos gerados em géis de poliacrilamida ou agarose (Strachan e Read, 2002).

### 1.2.7. Oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO)

Utiliza-se oligonucleotídeos alelo-específicos (sondas) marcados radioativamente numa reação de hibridização com o DNA amplificado por PCR. Uma sonda é complementar à seqüência do alelo normal e uma outra é complementar ao alelo mutante. A detecção dessas sondas é realizada pela técnica de *Southern blotting*. Qualquer alteração na seqüência do gene pode ser identificada por esse sistema, desde que esta alteração já tenha sido descrita (Férec *et al*, 2004).

### 1.2.8. Sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS)

ARMS-PCR é um método utilizado para detecção de qualquer mutação envolvendo mudança de uma única base ou pequenas deleções. O teste ARMS consiste de 2 reações complementares. A primeira reação é realizada na presença de um *primer* que apresenta a região 3' correspondente a seqüência normal e não consegue amplificar a seqüência mutante de um dado locus. A segunda reação contém um *primer* que apresenta a região 3' correspondente a seqüência mutante e não amplifica a seqüência normal. O genótipo de um indivíduo é determinado pela análise dos produtos de amplificação. Um indivíduo normal gera produtos apenas na reação normal, um heterozigoto apresenta produtos nas duas reações, e um homozigoto mutante tem amplificação apenas na reação mutante (Ferrie *et al*, 1992).

### 1.2.9. PCR em tempo real

O PCR em tempo real pode ser usado para genotipagem, entre outras aplicações. Dois sistemas de fluorescência podem ser empregados, as sondas de hibridização ou *Sybr Green*, dependendo do tipo de alteração gênica.

As sondas de hibridização são pequenas seqüências de DNA marcadas nas extremidades 5' e 3' com um composto fluorescente e um bloqueador, respectivamente. As sondas são produzidas de maneira a hibridizar perfeitamente com um alelo específico em um determinado locus, porém de forma incompleta com outro alelo (Hirata *et al*, 2006). No caso do sistema TaqMan<sup>®</sup>, o qual se baseia na utilização da atividade 5' → 3' da *Taq*

DNA-polimerase, durante a reação de PCR ocorrerá a extensão de uma nova fita de DNA até encontrar a sonda, a qual será degradada pela atividade exonucleásica 5'→3' da enzima, ocasionando a liberação do grupo fluorescente gerando um sinal fluorescente detectável pelo sistema de filtros do equipamento de PCR em tempo real (Strachan e Read, 2002).

O *Sybr Green* é uma molécula que emite fluorescência quando ligada à dupla fita de DNA. O aumento do sinal fluorescente é diretamente proporcional ao número de amplicons gerados durante a reação de PCR. Esse fluoróforo pode ser usado na detecção da amplificação de qualquer produto de PCR (<http://www.appliedbiosystems.com>).

O maior problema atual no diagnóstico genético laboratorial é a falta de um método rápido, barato e confiável para fazer isso. Todas as técnicas utilizadas atualmente são úteis na identificação de mutações no gene CFTR, porém, na sua maioria, esses sistemas de detecção são trabalhosos e, conseqüentemente, dependem de um longo tempo para a obtenção do resultado.

Em vista de um tratamento mais eficiente, um diagnóstico rápido e específico é de extrema importância considerando qualquer doença genética, podendo, muitas vezes, melhorar o prognóstico do paciente. Um diagnóstico específico também é importante para o aconselhamento genético para essas famílias antes de uma possível nova gestação. Todas essas considerações também são aplicáveis para casos de pacientes com FC.

Para tanto, a introdução de um sistema de diagnóstico rápido e sensível na rotina de um laboratório que realiza diagnóstico molecular de FC é desejável e pode ser alcançado através da utilização de sondas de hibridização alelo-específicas no sistema de PCR em tempo real.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral a introdução de um protocolo de detecção de mutações associadas à FC.

Os objetivos específicos se encontram relacionados abaixo:

- a) otimizar uma metodologia semi-automatizada para a detecção de mutações no gene CFTR utilizando PCR em tempo real;
- b) identificar a presença das mutações  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X e N1303K em uma população composta por pacientes que apresentam suspeita clínica de FC;
- c) estabelecer a frequência dessas mutações na população analisada;
- d) comparar os resultados encontrados com outros trabalhos realizados no Brasil e com dados internacionais.

### **3. ARTIGO**

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de um manuscrito que será submetido para publicação na revista *Clinical Chemistry*.

Allelic discrimination assays for five common mutations in the CFTR gene  
using TaqMan probes.

Deise C Friedrich<sup>1,2,3</sup>, Hugo Bock<sup>2,3</sup>, Maria-Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Genetics Department, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Molecular Genetics Laboratory, Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Genetics Identification Laboratory, Research Centre – Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

**Address to correspondence:**

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Genética Médica  
Ramiro Barcelos 2350 – CEP 90035-903  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil  
e-mail: mlpereira@hcpa.ufrgs.br  
Phone: + 55 51 21018011  
Fax: + 55 51 21018010

Running title: Detection of CFTR gene mutations by real time PCR

Abbreviations: CF = cystic fibrosis, CFTR = cystic fibrosis transmembrane conductance  
regulator

## Abstract

**Background:** Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the CFTR gene. Up to date, more than 1,500 mutations were identified in the CFTR gene and  $\Delta F508$  mutation is still the most frequent alteration. The aim of this study was to introduce a novel mutation detection system to be applied in the laboratory routine, and to estimate frequency of  $\Delta F508$ , G542X, G551D, N1303K, and R553X mutations.

**Methods:** Sample was composed by 190 unrelated patients with clinical suspicion of CF from Rio Grande do Sul state, Brazil. Mutations were analyzed by real-time PCR using hybridization probes, through TaqMan strategy. PCR reaction was performed according to manufacture's instruction. Mutation frequencies were analyzed by Z test, and p-value was generated by PEPI for Windows Software.

**Results:** Allelic as well as genotypic frequencies were established in the sample as a whole and in two subsets according to the strength of clinical suspicion. Within group with a strong clinical suspicion, a mutation was identified in 57.20% (56 out of 98) of alleles and genotype was established in 40.80% (20 out of 49) of patients.

**Conclusions:** Considering both subsets and their respective allelic frequencies, we clearly demonstrated that a strong clinical suspicion is essential for increasing identification of mutant alleles. In summary, the proposed real-time PCR using hybridization probes was effective and simple to be employed in a routine laboratory to detect mutations in the CFTR gene. In addition, this system is potentially suitable for neonatal screening and other large scale programs.

**Keywords:** Cystic Fibrosis, CFTR gene, Mutations, Real-Time PCR, South Brazil



## Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene (1). This gene is located on chromosome 7q31.2, spans about 250 kb of DNA, and encodes for a protein of 1480 amino acids with a molecular mass of 168 kDa (1-4). CFTR protein is mainly found in exocrine glands and secretory epithelia, functioning as a chloride channel regulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (1,5).

CF affects airways, sweat glands, pancreas, intestine, male genital tract, and hepatobiliary system. In the airways, lung is the major organ affected, and the most obvious defect in this organ of CF patients appears to arise from defective ion transport across epithelia. Pathogenesis of CF disease includes defective antimicrobial activity in airway surface liquid, altered mucociliary clearance, abnormal submucosal gland function, and enhanced inflammatory response. Patients become chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* that cause chronic sputum production, airway obstruction, bronchiectasis, and lung destruction (1).

The  $\Delta F508$  mutation (3) was the first CF mutation identified and accounts for about 66 percent of CF alleles in European-derived Caucasian populations (1). Up to date, more than 1,500 mutations were identified and common alterations worldwide are  $\Delta F508$ , G542X, G551D, N1303K, W1282X, R553X, 621+1G>T, 17171-1G>A, R117H, and R1162X which account for 75.1% of all mutations (6). Although, frequencies are variable among populations, specific mutations show high prevalence in determined regions. In

Brazil, mutation frequency can be quite variable. A typical example is  $\Delta F508$  frequency that can vary from 48.7% in Rio Grande do Sul state (South Brazil) (7) to 22.7% in Belém state (North Brazil) (8).

Diagnosis of CF is based on two basic criteria, presence of at least one clinical feature and evidence of CFTR dysfunction. The sweat test is performed to detect gene dysfunction by an elevated sweat chloride concentration (1), but false-positive and false-negative results can occur (9). Therefore, identification of a disease-causing mutation in the CFTR gene is very important to confirm a CF diagnosis. However, this task can be difficult to reach due to the great number of disease-causing mutations. Besides, commonly available tools, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) and single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analyses, are time-consuming and labor-intensive.

The aim of this study was to introduce a new mutation detection system in the laboratory routine based on real-time PCR technology using fluorescently labeled hybridization probes, and to apply this novel protocol in the detection of  $\Delta F508$ , G542X, G551D, N1303K, and R553X mutations in patients with clinical suspicion of CF from South Brazil.

## Materials and methods

Sample was composed by 190 unrelated patients with clinical suspicion of CF. These patients were previously evaluated by the Pneumology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Rio Grande do Sul state, Brazil. All patients analyzed here are different from those patients included in a previous study performed in our laboratory (Streit *et al*, 2003). This project was approved by the Ethic Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and authors signed a Privacy and Reliability Term.

Peripheral blood sample was collected in a tube containing EDTA. Genomic DNA was isolated by salting-out technique, as described previously (10). DNA was quantified using a fluorometric system (Quant-iT™ ds DNA BR Assay kit, Invitrogen, Oregon, USA) in the Qubit™ fluorometer equipment (Invitrogen, Oregon, USA).

Common CF mutations, named  $\Delta F508$ , G542X, G551D, R553X, and N1303K, were analyzed separately by a method that employs fluorescently labeled hybridization probes (TaqMan® MGB probes). Allelic discrimination (normal or mutant) was determined through the TaqMan® system (Applied Biosystems, California, USA) in real-time PCR system (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, California, USA). Primers and probes were designed according to Primer Express™ Software (version 2.0 – Applied Biosystems), and each sequence is shown in table 1.

PCR reaction was performed according to manufacture's instructions using 2 ng of DNA per reaction. Amplification program included an initial step at 50°C for 2 min (activation of AmpErase UNG function), AmpliTaq® Gold activation at 95°C for 10 min, followed by 40

cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min, followed by allelic discrimination step at 60°C for 1 min.

We have used four different positive controls that were previously characterized by other methodology. These positive controls were distributed as follows: a homozygous for  $\Delta F508$ , a heterozygous for  $\Delta F508$ , a heterozygous for G542X, and a heterozygous for R553X mutation. We did not have positive controls for G551D and N1303K mutations. We have also used confirmed negative controls for each mutation.

PCR products were analyzed by Sequence Detection System Software (version Applied Biosystems) using the allelic discrimination plot. Mutation frequencies were analyzed by Z test and p-value was generated by PEPI for Windows Software.

## Results

As a whole, we have found 69 out of 380 (18.16%) alleles carrying a mutation. These mutant alleles were distributed as follows: 60/380 (15.80%) carrying  $\Delta F508$  mutation, 5/380 (1.30%) carrying G542X mutation, 4/380 (1.10%) carrying N1303K mutation, and the remaining 311 out of 380 (81.84%) alleles did not carry any of these mutations studied. No alleles were identified to carry either G551D or R553X mutations, although positive control for R553X mutation was correctly discriminated by the applied system. These results are summarized in table 2.

In order to have a clearer view, we divided our samples into two sub-groups, according to the strength of clinical suspicion. First group was composed by 98 samples from patients with a strong clinical suspicion that means showing at least two CF characteristic signs and/or symptoms, such as high levels of ion chloride in sweat, satisfactory response to treatment, family history of CF. Mutation distribution in this group were 49/98 (50.00%) carrying  $\Delta F508$  mutation, 4/98 (4.10%) carrying G542X mutation, 3/98 (3.10%) carrying N1303K mutation, and the remaining 42 out of 98 (42.80%) alleles did not carry any of these mutations studied. Second group was composed by 282 samples from patients with weak clinical suspicion that means showing only one sign and/or symptom. Mutation distribution in this group were 11/282 (3.90%) carrying  $\Delta F508$  mutation, 2/282 (0.70%) carrying N1303K mutation, and the remaining 269 out of 282 (95.40%) alleles did not carry any of these mutations studied. Table 2 summarizes all this data.

Frequency of  $\Delta F508$  mutation was then compared to others studies carried out in Brazil; these results are shown in table 3. As this study was more comprehensive than published

data in Brazilian individuals, we were unable to compare frequencies of other common mutations.

In terms of patients' genotypes, the distribution was as follows: 14 (7.40%) were defined as  $\Delta F508/\Delta F508$ , 3 (1.60%) were  $\Delta F508/N1303K$ , 2 (1.05%) were  $\Delta F508/G542X$ , 1 (0.50%) was  $G542X/G542X$ , 27 (14.20%) were defined as  $\Delta F508/?$ , 2 (1.05%) were  $N1303K/?$ , while 141 (74.20%) samples did not carry any of mutations tested. Table 4 shows these results. Differences in genotype frequencies in the two sub-groups can be also seen in table 4.

Taking into account detection of  $\Delta F508$  mutation only, as the unique mutation tested for in our laboratory in cases of clinical suspicion of CF, we would be capable of identify a mutation in 50.00% (49 out of 98 alleles) of mutant alleles and to define a genotype in 28.60% (14 out of 49) of patients. Yet, using protocol proposed here (real-time PCR for 5 common mutations), we were able to define 57.20% (56/98) of mutant alleles and to establish a complete molecular diagnosis in 40.80% (20/49) of patients.

## Discussion

We have identified 18.20% mutant alleles in the total of 380 alleles tested that were sent for evaluation based on clinical suspicion of CF. However, considering just samples with a strong clinical suspicion, this rate rose to 57.20% of mutant alleles. This proportion is very similar to the study of Streit *et al* (7) that identified 54.50% mutant alleles.

All published studies performed with Brazilian individuals up to date analyzed only alleles from confirmed CF patients such as the subset we have made in order to compare our data (7-8, 11-12). In addition, majority of these studies only reported frequency of  $\Delta F508$  mutation. Hence,  $\Delta F508$  mutation frequency estimated in the present study (50.00%) is lower than the worldwide frequency (66.00%) ( $p < 0.0001$ ) (13), and higher than frequency found in Rio de Janeiro (30.70%) ( $p = 0.005$ ) (12), and in Belém (22.70%) ( $p < 0.0001$ ) (8). However,  $\Delta F508$  frequency found in our study is similar with a study performed in São Paulo (11), 44.40% ( $p = 0.195$ ), and with a previous study carried out in our laboratory (7), 48.70% ( $p = 0.471$ ). These differences and similarities can be explained by racial admixture in Brazil as well as by the uneven ethnic distribution due to several migration waves throughout several years.

Frequencies of N1303K and G542X mutations were established to be 3.10%, and 4.10%, respectively. These frequencies are similar to those established worldwide that are 1.34% ( $p = 0.133$ ), and 2.40% ( $p = 0.39$ ), respectively (13).

Considering both subsets and their respective allelic frequencies, we clearly demonstrated that a strong clinical suspicion is essential for increasing identification of mutant alleles. This was observed by differences found when comparing frequencies of  $\Delta F508$  mutation (50.00% and 3.90%) ( $p < 0.0001$ ), and N1303K mutation (3.10% and 0.70%) ( $p < 0.0001$ ).

Moreover, in this study we have shown that mutation detection system based on real-time PCR technology was able to detect  $\Delta F508$ , G542X, N1303K, and R553X mutations using low amount of DNA. The reaction was also optimized for G551D mutation however we did not have positive control for this mutation. The whole procedure is performed within a short period of time, which is crucial in clinical practice. Besides, system proposed here increased the number of patients with a molecular diagnosis in our lab, from 14 (homozygous for  $\Delta F508$ ) to 20 (carrying different genotypes), with a decrease in time of analysis. Furthermore, this rate can be improved if other common mutations are introduced in the actual system, which may be easily achieved with no significant growth in time of analysis.

In summary, the proposed real-time PCR using hybridization probes was effective and simple to be employed in a routine laboratory to detect  $\Delta F508$ , G542X, N1303K, and R553X mutations in the CFTR gene. In addition, this system is potentially suitable for neonatal screening and other large scale programs.



## Acknowledgments

We would like to thank patients and their families for providing biological material for this study. We would also thank Thais Stanoski Santa Rita for technical support and physicians from Pneumology Service for patients' clinical evaluation. This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq, PRONEX and FIPE-HCPA).

## References

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2001, 8<sup>th</sup> edn, pp 5121-80.
2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 1989; 245: 1059-65.
3. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, Buchwald M, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 1989; 245: 1073-80.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science*, 1989; 245: 1066-73.
5. Uzun S, Gökçe S, Wagner K. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Tohoku J Exp Med*, 2005; 207(4): 279-85.
6. Cystic Fibrosis Mutation Database: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

7. Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab*, 2003; 78: 259-64.
8. Araújo FG, Novaes FC, Santos NPC, Martins VC, Souza SM, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC. Prevalence of  $\Delta F508$ , G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 2005; 38: 11-5.
9. LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. *J Pediatr*, 1996; 129: 892-7.
10. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 1998, 16:1215.
11. Okay TS, Oliveira WP, Raiz-Junior R, Rodrigues, JC, Negro GMBD. Frequency of the  $\Delta F508$  mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics*, 2005; 60(2): 131-4.
12. Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena Jr J, Greg J, Grody WW, Degraeve WW. Cystic fibrosis: low frequency of the  $\Delta F508$  mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol*, 1999; 71: 189-96.
13. Genetests homepage. <http://www.geneclinics.org> (Accessed in January 2007)

14. Pereira L, Raskin S, Freund AA, Ribas P, Castro R, Pignatti P, Culpi L. Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183 AA→G in two southern Brazilian states. *Gen. Mol. Biol.*, 1999; 22(3): 291-4.

Table 1

Sequences of primers and probes used in this study.

Mutation	Primer sequence (5' → 3')	Probe sequence (5' → 3')
ΔF508	Forward	Normal
	GGATTATGCCTGGCACCATTAAAGA	CACCAAAGATGATATTT-VIC
	Reverse	Mutated
	ATGCTTTGATGACGCTTCTGTATCT	AAACACCAATGATATTT-FAM
G542X	Forward	Normal
	GGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCA	ACCTTCTCCAAGAACT-VIC
	Reverse	Mutated
	GACCTCCACTCAGTGTGATTCC	ACCTTCTCAAAGAACT-FAM
G551D	Forward	Normal
	GTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACA	CTGAGTGGAGGTCAACGA-VIC
	Reverse	Mutated
	TGCTTGCTAGACCAATAATTAGTTATTCACC	CTGAGTGGAGATCAACGA-FAM
R553X	Forward	Normal
	GAGAAGGTGGAATCACACTGAGT	AAATTCTTGCTCGTTGACC-VIC
	Reverse	Mutated
	CAGCAAATGCTTGCTAGACCAATAAT	ATTCTTGCTCATTGACC-FAM
N1303K	Forward	Normal
	GTTATTCATACTTTCTTCTTTTCTTTTTTGC	CATAGGGATCCAAGTTT-VIC
	TATAGA	Mutated
	Reverse	ATAGGGATCCAAGTTT-FAM
	CCTTACCTCATCTGCAACTTTCCATAT	

Table 2

Allelic frequencies of common CF mutations.

Alleles	Clinical suspicion of CF		Strong clinical suspicion of CF		Weak clinical suspicion of CF		World frequency in European-derived populations (%)
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)	
$\Delta$ F508	60	15.80	49	50.00	11	3.90	66.00
				(p < 0.0001)*			
G542X	5	1.30	4	4.10	0	-	2.40
				(p = 0.390)			
N1303K	4	1.10	3	3.10	2	0.70	1.34
				(p = 0.133)			
G551D	0	-	0	-	0	-	1.60
R553X	0	-	0	-	0	-	0.70
?	311	81.80	42	42.80	269	95.40	
Total	380	100.00	98	100.00	282	100.00	

? Indicates mutations not identified. P-value was calculated comparing mutation frequencies of CF confirmed patients and mutation frequency reported worldwide. \* denotes statistically significant.

Table 3

Frequency of  $\Delta F508$  mutation established in this study compared to other studies in Brazil.

State (region)	Number of alleles	Frequency	P-value	Reference
Rio Grande do Sul (South)	98	50.0%		
Rio Grande do Sul (South)	154	48.7%	0.471	7
São Paulo (Southeast)	216	44.4%	0.195	11
Rio de Janeiro (Southeast)	88	30.7%	0.005*	12
Belém (North)	66	22.7%	<0.0001*	8

\* Statistically significant. P-value was calculated comparing frequencies of  $\Delta F508$  mutation from this study to previously published studies in Brazil.

Table 4

Genotypic frequencies established in this study.

Genotype	Clinical suspicion of CF		Strong clinical suspicion of CF		Weak clinical suspicion of CF	
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)
$\Delta$ F508/ $\Delta$ F508	14	7.40	14	28.60	0	-
$\Delta$ F508/N1303K	3	1.60	3	6.10	0	-
$\Delta$ F508/G542X	2	1.05	2	4.10	0	-
G542X/G542X	1	0.50	1	2.00	0	-
$\Delta$ F508/?	27	14.20	16	32.70	11	7.80
N1303K/?	2	1.05	0	-	2	1.42
?/?	141	74.20	13	26.50	128	90.78
Total	190	100.00	49	100.00	141	100.00

? Indicates not identified mutations.



## 4. DISCUSSÃO

O método tradicional de diagnóstico molecular para a FC utilizado na rotina do nosso laboratório consistia somente na amplificação da região da mutação  $\Delta F508$  e na análise do produto por eletroforese em gel de poliacrilamida. Comparando-se essa metodologia com a estabelecida por esse estudo, observamos um aumento do número de pacientes com diagnóstico molecular (de 14 para 20). Pelo método anterior, o diagnóstico molecular foi atingido em 28,60% dos 49 pacientes com forte suspeita clínica de FC. Através do PCR em tempo real, o diagnóstico molecular foi alcançado em 40,80% dos pacientes, e, o mais importante, em um curto período de tempo. Mas, a quantidade de pacientes com diagnóstico molecular poderia aumentar se um maior número de mutações fossem analisadas, o que é totalmente viável visto que o PCR em tempo real é uma técnica de fácil execução.

A metodologia aplicada permitiu a identificação de 6 genótipos diferentes entre os 190 pacientes com suspeita clínica de FC. O genótipo mais freqüente foi o heterozigoto composto para a mutação  $\Delta F508$ , sendo o outro alelo desconhecido, com uma freqüência estimada em 14,20%. O segundo genótipo mais freqüente foi o homozigoto para a mutação  $\Delta F508$ , encontrado em 7,40% dos pacientes. Os genótipos  $\Delta F508/N1303K$ ,  $\Delta F508/G542X$ ,  $G542X/G542X$  e heterozigoto para a mutação  $N1303K$  apresentaram freqüência mais baixa, sendo estabelecidas em 1,60%, 1,05%, 0,50% e 1,05%, respectivamente.

Em um total de 380 alelos estudados, foi identificada mutação em 18,20% dos alelos. Como já esperado, a mutação  $\Delta F508$  apresentou maior freqüência (15,80%). As mutações  $N1303K$  e  $G542X$  apareceram em freqüências menores, sendo elas 1,30% e 1,10%, respectivamente. As mutações  $R553X$  e  $G551D$  não foram encontradas nessa amostra.

Entretanto, quando separamos a amostra em dois grupos e analisamos somente os alelos dos pacientes com forte suspeita clínica de FC, identificamos 57,20% dos alelos mutantes. Esta porcentagem de detecção de mutação é similar a porcentagem de 54,70% de alelos mutados encontrada em um estudo prévio do nosso laboratório (Streit *et al*, 2003).

Os estudos que se propõem detectar mutações no gene CFTR, como os citados nesse trabalho (Streit *et al*, 2003; Araújo *et al*, 2005; Okay *et al*, 2005; Cabello *et al*,

1999), analisaram somente alelos de pacientes com FC confirmada, diferentemente da nossa amostra. Para testarmos o método, todos os pacientes com suspeita clínica de FC avaliados pelo Serviço de Pneumologia do HCPA foram analisados quanto a mutações no gene CFTR. Porém, para nos adequarmos a literatura e para fins estatísticos, as análises foram realizadas somente entre os pacientes com FC confirmada.

A frequência de alelos mutados para  $\Delta F508$  neste estudo foi de 50%. Esta frequência é significativamente ( $p < 0,0001$ ) mais baixa do que a frequência mundial observada em populações euro-descendentes de 66% ([www.geneclinics.org](http://www.geneclinics.org)). Mesmo sendo nosso estado colonizado por euro-descendentes, a miscigenação que ocorreu e continua ocorrendo pode ser responsável pela diminuição da frequência dessa mutação.

Ao contrário, quando comparamos a frequência encontrada com outros estudos realizados no Brasil, esta é significativamente mais alta do que a frequência do Rio de Janeiro (Cabello *et al*, 1999), 30,70% ( $p = 0,005$ ) e de Belém (Araújo *et al*, 2005), 22,70% ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, esse estudo reforça outro realizado no nosso laboratório (Streit *et al*, 2003), no qual a frequência de  $\Delta F508$  foi estabelecida em 48,70% ( $p = 0,471$ ) e é similar ao estudo realizado em São Paulo (Okay *et al*, 2005) onde a frequência desta mutação foi de 44,40% ( $p = 0,195$ ).

As frequências das mutações N1303K e G542X foram 3,10% e 4,10%, respectivamente. Estas frequências não diferem significativamente do observado mundialmente na população euro-descendente, N1303K com 1,34% ( $p = 0,133$ ), G542X com 2,40% ( $p = 0,39$ ) ([www.geneclinics.org](http://www.geneclinics.org)). As mutações G551D e R553X não foram observadas em nossa amostra.

Considerando os dois subgrupos e suas respectivas frequências alélicas, nós claramente demonstramos que uma suspeita clínica forte é essencial para a identificação dos alelos mutantes. Isto foi observado pelas diferenças encontradas quando comparamos as frequências das mutações  $\Delta F508$  (50,0% e 3,9%) ( $p < 0,0001$ ) e N1303K (3,1% e 0,7%) ( $p < 0,0001$ ) nos dois subgrupos.

As frequências das mutações no subgrupo com suspeita clínica fraca foram mais baixas e possivelmente ocorrem pelo fato destes pacientes não serem portadores de FC, visto que eles foram encaminhados apresentando um único sintoma, como pancreatite ou infecções respiratórias recorrentes. Esses sintomas podem ocorrer em uma série de outras

patologias, sendo pouco sugestivas de FC quando não estão acompanhadas por outro sinal e/ou sintoma característico desta doença.

No Brasil, é esperado que a incidência de FC tenha diferenças regionais pelos diferentes padrões de mistura racial. Além disso, a população brasileira euro-descendente não é etnicamente homogênea. Enquanto nos estados mais ao norte do país a contribuição de Portugueses prevalece, diferentes ondas de imigrações européias causaram maior diversidade étnica nas regiões mais ao sul do país (Pereira *et al*, 1999). Corroborando este fato, esse estudo mostra que as frequências das mutações no gene CFTR na região sul são diferentes de outras regiões do país e são diferentes das frequências mundiais. Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizarmos nossa população em relação às frequências das mutações no gene CFTR. Provavelmente, mutações menos frequentes devem estar ocorrendo mais frequentemente nessa amostra e deveriam ser testadas para nossa população.

Finalizando, o PCR em tempo real proposto usando sondas de hibridização foi efetivo e muito simples de ser usado como um método de diagnóstico para FC e para detectar as mutações  $\Delta F508$ , G542X, N1303K e R553X. Além disso, esse sistema é potencialmente adequado para programas de triagem neonatal e outros programas em larga escala.

## 5. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho podemos concluir que:

- ✓ A tecnologia de PCR em tempo real utilizando sondas de hibridização fluorescentes mostrou-se eficiente e adequada para a detecção de mutações no gene CFTR;
- ✓ As mutações  $\Delta F508$ , G542X e N1303K foram identificadas na nossa amostra pela metodologia proposta;
- ✓ As mutações G551D (sem controle positivo) e R553X (com controle positivo) não foram encontradas na população estudada;
- ✓ As mutações  $\Delta F508$ , G542X e N1303K apresentaram as frequências 15,80%, 1,30% e 1,10%, respectivamente;
- ✓ A forte suspeita clínica de FC, ou seja, a presença de mais de um sintoma, aumenta a taxa de identificação da presença de mutações no gene CFTR;
- ✓ As frequências das mutações  $\Delta F508$ , G542X e N1303K quando os alelos analisados foram somente de pacientes com forte suspeita clínica de FC foram 50,00%, 4,10% e 3,10%, respectivamente;
- ✓ As frequências das mutações encontradas foram diferentes das frequências mundiais, sendo menor para a mutação  $\Delta F508$  e maiores para as mutações G542X e N1303K;
- ✓ A frequência da mutação  $\Delta F508$  no Rio Grande do Sul mostrou-se maior do que em outros estados do Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmed N, Corey M, Forstner G, Zielenski J, Tsui L-C, Ellis L, Tullis E and Durie P (2003) Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut* 52: 1159-1164.
- Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, Maher TA, White MB and Milunsk A (1992) Congenital bilateral absence of the vas deferens: A primarily genital form of cystic fibrosis. *Jama* 267: 1794-1797.
- Araújo FG, Novaes FC, Santos NPC, Martins VC, Souza SM, Santos SEB and Ribeiro-dos-Santos AKC (2005) Prevalence of  $\Delta F508$ , G551D, G542X, and G553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 38: 11-15.
- Audrézet MP, Costes B, Ghanem N, Fanen P, Verlingue C, Morin JF, Mercier B, Goossens M and Férec C (1993) Screening for cystic fibrosis in dried blood spots of newborns. *Mol Cell Probes* 7: 497-502.
- Avarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS and Ribeiro JD (2004) Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. *J Pediatr* 80(5): 371-379.
- Berger A, Ikuma M and Welsh MJ (2005) Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *PNAS* 102(2): 455-460.
- Borges-Osório MR and Robinson WM (2001) *Genética Humana*. 2ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 459 pp.
- Boucher RC (2002) An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1359-1371.
- Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena Jr J, Greg J, Grody WW and Degraeve WW (1999) Cystic fibrosis: low frequency of the  $\Delta F508$  mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol* 71: 189-196.
- Cabello GM, Cabello PH, Roig SRS, Fonseca A, Carvalho ECD and Fernández O (2003) Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação  $\Delta F508$ . *J Bras Patol Med Lab* 39(1): 15-20.
- Chmiel JF and Davis PB (2003) State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 4:8-20.
- Dempsey E, Barton DE and Ryan F (2004) Detection of five common CFTR mutation by Rapid-Cycle Real-Time Amplification Refractory Mutation System PCR. *Clin Chem* 50(4): 773-775.

- Dinwiddie R (2005) Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 45-48.
- Fagundes EDT, Roquete MLV, Penna FJ, Reis FJC and Duque CG (2002) Triagem diagnóstica da hepatopatia da fibrose cística. *J Pediatr* 78(5): 389-396.
- Férec C, Marechal CL, Audrézet MP, Farinha CM, Amaral MD, Gallati S, Sanz J, Steiner B, Mouchel N, Harris A and Schwarz MJ (2004) Analysis of genomic CFTR DNA. *Journal of Cystic Fibrosis* 3: 7-10.
- Ferrie RM, Schwarz MJ, Robertson NH, Vaudin S, Super M, Malone G and Little S (1992) Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. *Am J Hum Genet* 51: 251-262.
- Fiates GMR, Barbosa E, Auler F, Feiten SF and Miranda F (2001) Estado nutricional e ingestão alimentar de pessoas com fibrose cística. *Rev Nutr* 14(2): 95-101.
- Filho LVFS, Bussamra MHCF, Nakaie CMA, Adde FV, Rodrigues JC, Raskin S and Rozov T (2003) Fibrose cística com dosagem de cloro no suor normal – relato de caso. *Rev. Hosp. Clin* 58(5): 260-262.
- Friedman KJ, Heim RA, Knowles MR and Silverman LM (1997) Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene: association of the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum mutat* 10: 108-115.
- Gibson LE and Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-599.
- Gracia J, Mata F, Casals T, Gatner S, Vendrell M, de la Rosa D, Guarner L and Hermosilla E (2005) Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 60: 558-563.
- Griesenbach U and Boyd AC (2005) Review: Pre-clinical and clinical endpoint assays for cystic fibrosis gene therapy. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 89-100.
- Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Georges MD, Guittard C, Koudova M et al (2004) 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* 74: 176-179.
- Groman JD, Karczeski B, Sheridan M, Robinson TE, Fallin D and Cutting GR (2005) Phenotypic and genetic characterization of patients with features of “non classic” forms of cystic fibrosis. *J Pediatr* 146: 675-680.
- Heijerman H (2005) Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 3-5.

- Hirata MH, Tavares V and Hirata RDC (2006) Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *Medicina* 39: 522-534.
- Hughes D, Dörk T, Stuhmann M and Graham C (2001) Mutation and haplotype analysis of the CFTR gene in atypically mild cystic fibrosis patients from Northern Ireland. *J Med Genet* 38: 136-139.
- Kámory E, Csókay B and Holló Z (2004) Rapid detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene IVS8 5T variant by real-time PCR. *Clin Chem* 50(10): 1837-39.
- Keller BM, Aebischer CC, Kraemer R and Schöni MH (2003) Growth in prepubertal children with cystic fibrosis, homozygous for the  $\Delta F508$  mutation. *Journal of Cystic Fibrosis* 2: 76-83.
- Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, Buchwald M and Tsui L-C (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-80.
- Knowles MR and Durie PR (2002) What is Cystic Fibrosis? *N Engl J Med* 347(6): 439-442.
- LeGrys VA (1996) Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. *J Pediatr* 129: 892-897.
- Lemos AC, Matos E, Franco R, Santana P and Santana MA (2004) Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. *J Bras Pneumol* 30(1): 9-13.
- Li C and Naren AP (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther* 108: 208-223.
- Malfroot A, Adam G, Ciofu O, Döring G, Knoop C, Lang AB, Damme PV, Dab I and Bush A (2005) Immunisation in the current management of cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 77-87.
- Mckone EF, Emerson SS, Edwards KL and Aitken ML (2003) Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 361: 1671-1676.
- Mishra A, Greaves R and Massie J (2005) The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev* 26: 135-153.
- Morales MM, Capella MAM and Lopes AG (1999) Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz J Med Biol Res* 32(8): 1021-1028.
- Okay TS, Oliveira WP, Raiz-Junior R, Rodrigues, JC and Negro GMBD (2005) Frequency of the  $\Delta F508$  mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics* 60(2): 131-134.

- Oliveira MCLA, Reis FJC, Monteiro APAF and Penna FJ (2002) Effect of meconium ileus on the clinical prognosis of patients with cystic fibrosis. *Braz J Med Biol Res* 35(1): 31-38.
- Pereira L, Raskin S, Freund AA, Ribas P, Castro P, Pignatti P and Culpi L (1999) Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA→ G in two southern Brazilian states. *Gen Mol Biol* 22(3): 291-94.
- Peretti N, Marcil V, Drowin E and Levy E (2005) Mechanisms on lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab* 2: 11-28.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS and Tsui L-C (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 245: 1066-73.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C and Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-65.
- Slieker MG, Sanders EAM, Rijkers GT, Ruven HJT and van der Ent CK (2005) Disease modifying genes in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 7-13.
- Stern RC (1997) Current Concepts: The Diagnosis of Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 336(7): 487-491.
- Strachan T and Read AP (2002) *Genética molecular humana*. 2<sup>a</sup> ed. Artmed Editora, Porto Alegre 529 pp.
- Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R and Pereira MLS (2003) CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab* 78: 259-264.
- Terheggen-Lagro SWJ, Rijkers GT and van der Ent CK (2005) The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 15-23.
- Uzun S, Gökçe S and Wagner K (2005) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Tohoku J Exp Med* 207(4): 279-285.
- Van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TFW and van der Ent CK (2005) Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 4: 31-36.
- Wang Z, Milunsky J, Yamin M, Maher T, Oates R and Milunsky A (2002) Analysis by mass spectrometry of 100 cystic fibrosis gene mutations in 92 patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod* 17(8): 2066-2072.



Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F and Cutting GR (2001) Cystic Fibrosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 5121-5180.

Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE and Falla TJ (2005) Antimicrobial Peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7): 2921-2927.

#### REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>: Cystic Fibrosis Mutation Database, página acessada em 05/02/2007.

<http://www.geneclinics.org>: Genetests homepage acessada em 30/01/2007

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>: OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man, página acessada em 03/02/2007.

<http://www.ghente.org>: Projeto Ghente – FioCruz, página acessada em 06/02/2007.

<http://www.appliedbiosystems.com>: Applied Biosystems homepage, acessada em 06/02/2007.

## **7. ANEXOS**

## 7.1. PROTOCOLO BÁSICO PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

Tabela 6.1. Reagentes e quantidades utilizadas na reação de PCR em tempo real para cada amostra.

Reagente	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) *	6	1X
40X Assay Mix **	0,3	1X
DNA genômico 2 ng/ $\mu\text{L}$	1	
Água	5,2	
Total	12,5	

\* Master Mix: consiste em uma mistura de dNTP, Taq polimerase, tampão de reação e cloreto de magnésio.

\*\* Assay Mix: consiste em uma mistura de *primers* direto e reverso, sondas complementares a sequência normal e mutante específicos para cada mutação.

## 7.2. RESULTADOS DO PCR EM TEMPO REAL

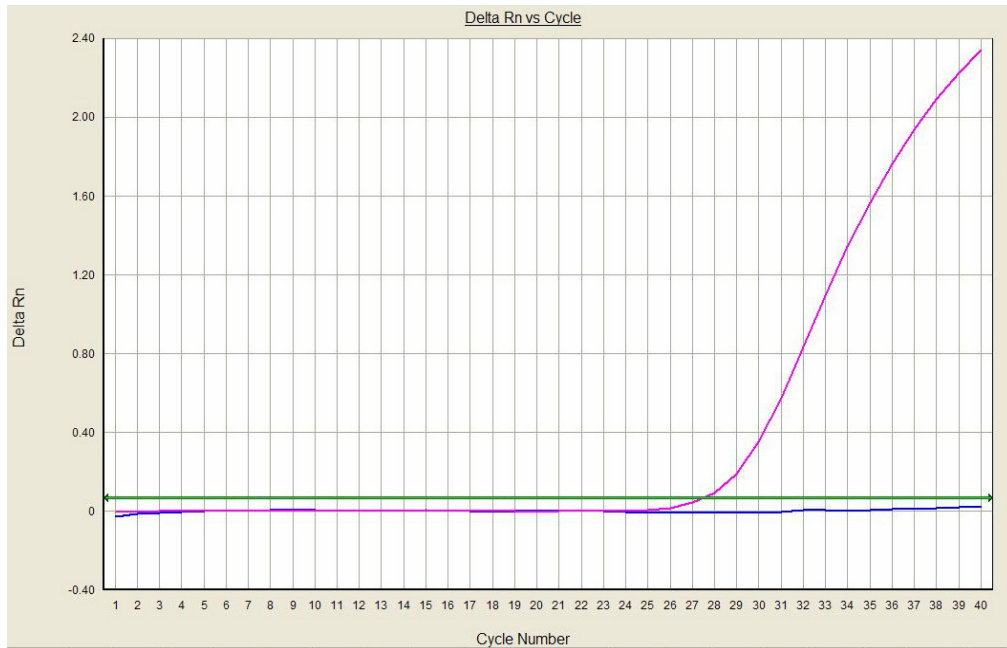


Figura 6.1. Gráfico de amplificação em escala linear de um indivíduo normal para a mutação  $\Delta F508$ . Linha rosa = fluorescência da sonda com a sequência normal. Linha azul = fluorescência da sonda com a sequência mutante. Linha verde = threshold.

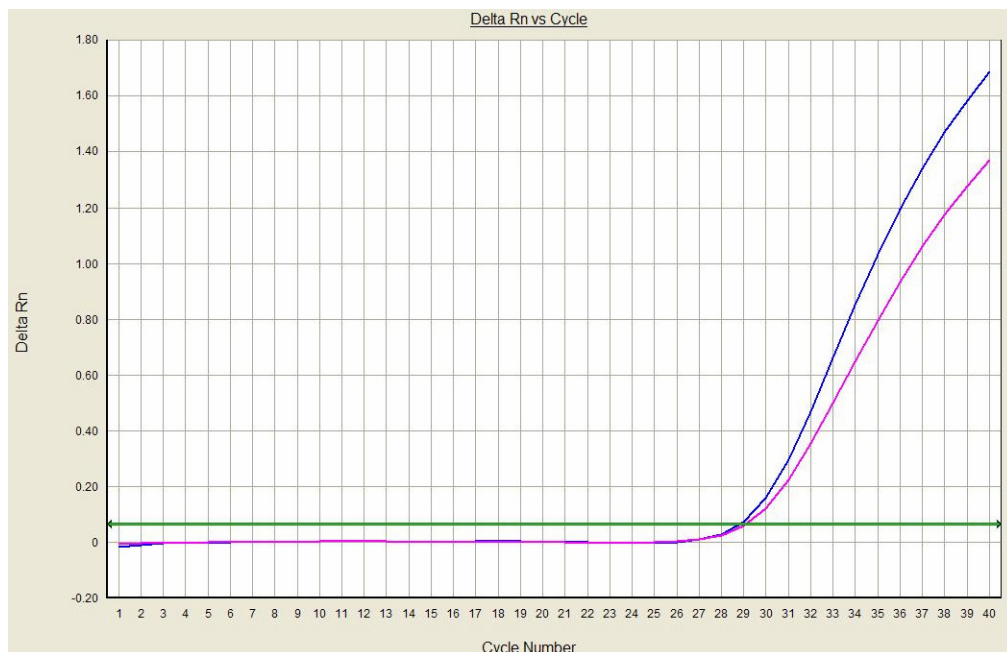


Figura 6.2. Gráfico de amplificação em escala linear de um indivíduo heterozigoto para a mutação  $\Delta F508$ . Linha rosa = fluorescência da sonda com a sequência normal. Linha azul = fluorescência da sonda com a sequência mutante. Linha verde = threshold.

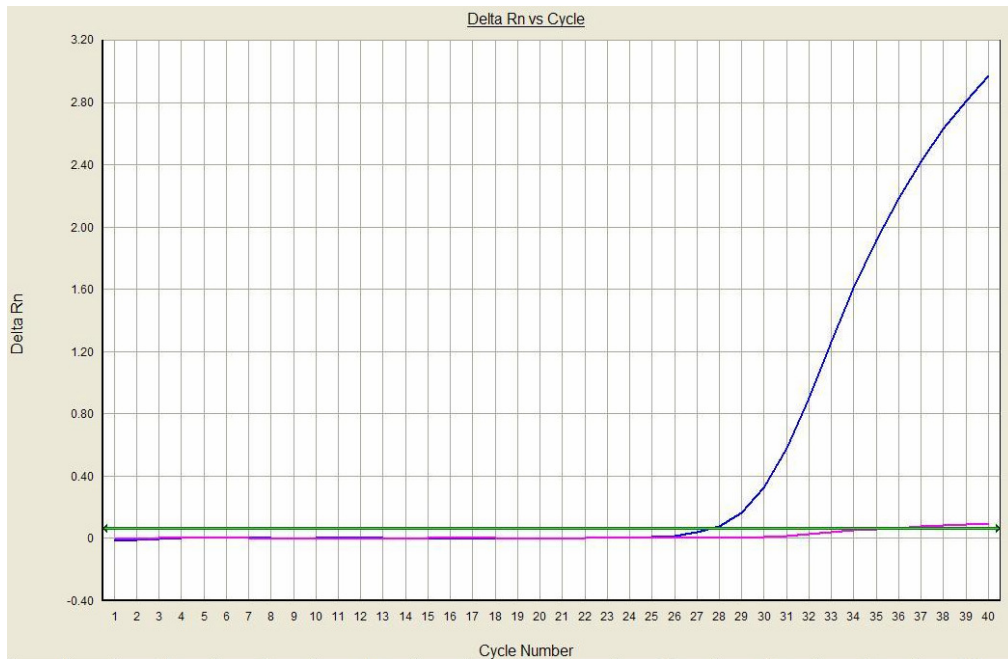


Figura 6.3. Gráfico de amplificação em escala linear de um indivíduo homozigoto para a mutação  $\Delta F508$ . Linha rosa = fluorescência da sonda com a sequência normal. Linha azul = fluorescência da sonda com a sequência mutante. Linha verde = threshold.

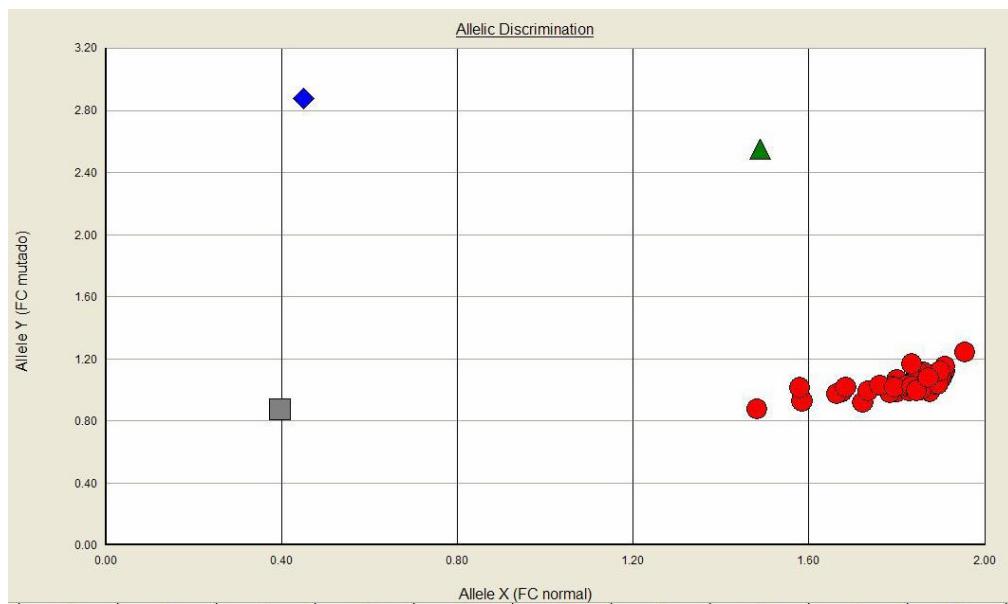


Figura 6.4. Gráfico da discriminação alélica da detecção da mutação  $\Delta F508$ .  $\blacklozenge$  = indivíduo homozigoto;  $\blacktriangle$  = indivíduo heterozigoto;  $\bullet$  = indivíduo normal;  $\blacksquare$  = controle negativo do PCR (sem DNA).