

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

# **Identificação de variações de sequência no gene *CFTR* em pacientes com Fibrose Cística**

Mariana Fitarelli Kiehl

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 2010.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

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

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, pelos ensinamentos, dedicação e paciência.

À minha mãe, Sonia, pelo incentivo e pelo amor incondicional, capaz de superar a saudade e a distância para que meus sonhos fossem realizados.

Ao meu marido, Hugo, pelo amor, companheirismo e por participar de maneira tão importante das minhas conquistas e dos meus sonhos.

Aos meus sogros, Cláudio e Maria Eugênia, por me receberem como filha, me amparando em todos os momentos.

Aos demais familiares pelas orações e pelo carinho a cada reencontro.

Aos amigos do Laboratório de Identificação Genética, pelos aprendizados, discussões e pelos momentos de descontração.

À Dra. Maria Teresa Sanseverino pelo auxílio na seleção dos pacientes com fibrose cística.

Às Instituições que forneceram o apoio financeiro e cultural: CNPq, FAPERGS, UFRGS e HCPA.

A Deus.

## SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS.....	ii
AGRADECIMENTOS .....	iii
SUMÁRIO .....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	vi
NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. FIBROSE CÍSTICA .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Manifestações clínicas .....</b>	<b>2</b>
<i>A. Trato respiratório .....</i>	<i>2</i>
<i>B. Pâncreas.....</i>	<i>3</i>
<i>C. Trato gastrointestinal .....</i>	<i>4</i>
<i>D. Doença hepatobiliar .....</i>	<i>5</i>
<i>E. Glândulas sudoríparas.....</i>	<i>5</i>
<i>F. Trato genitourinário .....</i>	<i>5</i>
<b>1.1.2. Gene CFTR .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. Proteína CFTR .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4. Mutações no gene CFTR.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5. Correlação genótipo-fenótipo.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.6. Diagnóstico .....</b>	<b>15</b>
<i>1.1.6.1. Diagnóstico pré-sintomático .....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.6.2. Diagnóstico sintomático .....</i>	<i>16</i>
<b>1.1.7. Tratamento .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES.....</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1. Análise de dissociação em alta resolução (HRM) .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Objetivo geral.....</b>	<b>25</b>

<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	25
<b>3. ARTIGO</b> .....	26
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>7. ANEXO</b> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABC	cassete de ligação a ATP ( <i>ATP-binding cassette</i> )
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
AP-1	proteína ativadora 1 ( <i>activator protein 1</i> )
ARMS	sistema de mutação refratário à amplificação ( <i>amplification refractory mutation system</i> )
ATP	adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
cAMP	adenosina monofosfato cíclica ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CBAVD	ausência bilateral congênita dos vasos deferentes ( <i>congenital bilateral absence of the vas deferens</i> )
Cl <sup>-</sup>	íon cloreto
CFMDB	<i>Cystic Fibrosis Mutation Database</i>
CFTR	gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística ( <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</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> )
ENaC	canal epitelial de sódio ( <i>epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> )
FC	fibrose cística
HRM	dissociação em alta resolução ( <i>high-resolution melting</i> )
IRT	tripsina imunorreativa ( <i>immunoreactive trypsin</i> )
K <sup>+</sup>	íon potássio
kb	quilobase
kDa	quilo Dalton
MBL2	lectina ligante de manose 2 ( <i>mannose binding lectin 2</i> )
MLPA	amplificação múltipla dependente de ligação de sonda ( <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> )
mmol/L	milimol por litro

mRNA	ácido ribonucleico mensageiro ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MSD	domínio de expansão de membrana ( <i>membrane-spanning domain</i> )
Na <sup>+</sup>	íon sódio
NBD	domínio de ligação de nucleotídeo ( <i>nucleotide binding domain</i> )
NMD	degradação mediada por códon de terminação ( <i>nonsense mediated decay</i> )
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKA	proteína cinase dependente de cAMP ( <i>cAMP-dependent protein kinase</i> )
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
SP1	fator de especificidade 1 ( <i>specificity factor 1</i> )
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples ( <i>single-stranded conformational polymorphism</i> )
TGFβ1	fator β de transformação de crescimento 1 ( <i>transforming growth factor β 1</i> )
TNFα	fator α de necrose tumoral ( <i>tumor necrosis factor α</i> )
T <sub>m</sub>	temperatura de dissociação ( <i>melting temperature</i> )

## NOMENCLATURA DAS MUTAÇÕES

Neste estudo, a nomenclatura adotada para as mutações no gene *CFTR* foi a tradicional, baseada nas recomendações de *Cystic Fibrosis Mutation Database* - CFMDB (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).



## RESUMO

A fibrose cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, com uma incidência estimada de 1 caso a cada 2.500 nascimentos. A FC é uma doença multissistêmica, caracterizada principalmente por doença pulmonar progressiva, disfunção pancreática exócrina e concentração elevada de eletrólitos no suor. O gene associado a essa doença é denominado *CFTR* e se localiza no cromossomo 7, sendo dividido em 27 éxons. Até o momento, mais de 1.600 variações de sequência foram identificadas no gene *CFTR*, sendo que a mutação F508del é a mais frequente entre os pacientes de FC. No Brasil, a frequência da F508del não é tão elevada, devido provavelmente à miscigenação e, conseqüentemente, o *locus CFTR* apresenta maior heterogeneidade alélica. Este fato dificulta o diagnóstico molecular dos pacientes com FC e metodologias de varredura para a detecção de mutações precisam ser utilizadas. O objetivo deste trabalho foi identificar alterações em regiões codificantes do gene *CFTR* em pacientes com FC provenientes da região sul do Brasil, através de análise de dissociação em alta resolução (HRM) e sequenciamento de DNA. Onze éxons e regiões adjacentes foram analisados por HRM e 10 alterações de sequência diferentes foram detectadas (R75Q, R334W, F508del, 1717-1G>A, G542X, R553X, 1812-1G>A, A561E, G576A e N1303K). Além disso, uma alteração denominada L453X, ainda não descrita na literatura, foi identificada em um paciente de FC através do sequenciamento do éxon 9 do *CFTR*. A região polimórfica (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> presente no íntron 8 foi caracterizada e nenhum paciente apresentou a variante alélica contendo 5T. Através da estratégia utilizada, 30 dos 52 alelos mutantes (57,7%) nos 26 pacientes incluídos nesse estudo foram identificados. O genótipo de 7 (26,9%) pacientes foi definido e alteração em um dos alelos mutantes foi identificada em 16 (61,6%) pacientes. Portanto, a aplicação do método HRM foi eficaz para identificação de variações de sequência em regiões do gene *CFTR* na amostra estudada. O método pode ser expandido para análise de toda a região codificante desse gene e, posteriormente, ser usado como metodologia de escolha para diagnóstico molecular de pacientes com suspeita clínica de FC, seja em casos sintomáticos como em programas de triagem neonatal.

## 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 live births. CF is a multisystem disease, characterized mainly by progressive obstructive pulmonary disease, pancreatic insufficiency, and high electrolytes levels of electrolytes in sweat. The gene responsible for CF, named *CFTR*, is located on chromosome 7 and is organized into 27 exons. Up to date, more than 1,600 sequence variations have been reported in *CFTR*, and the F508del mutation is the most frequent worldwide. In Brazil, F508del frequency is lower than in other countries probably due to population admixture. This indicates that *CFTR locus* can be more heterogeneous. Therefore, CF molecular diagnosis can be very hard and new methods for mutation scanning would be useful to improve this task. The aim of this work was to identify allelic variants in *CFTR* coding regions of CF patients from South Brazil through high-resolution melting (HRM) analysis and DNA sequencing. Eleven exons and adjacent regions were analyzed by HRM, and 10 different sequence variants were identified (R75Q, R334W, F508del, 1717-1G>A, G542X, R553X, 1812-1G>A, A561E, G576A and N1303K). A novel variant (L453X) was detected in *CFTR* gene through exon 9 DNA sequencing, besides these known mutations. The polyvariant (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> region at intron 8 was also analyzed and 5T allelic variant was not present in any allele. The strategy described above was able to identify 30 out of 52 CF mutant alleles (57.7%) in 26 patients. Genotype of 7 (26.9%) patients was defined and mutation in one mutant allele was identified in 16 (61.6%) patients. Therefore, application of HRM analysis was efficient to detect sequence variations in specific regions of *CFTR* gene in this sample population. The methodology can be expanded to cover the whole coding region of this gene. Subsequently, this methodology can be adapted to be applied in the molecular diagnosis of symptomatic CF cases as well as samples from neonatal screening 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 de 1 caso a cada 2.500 nascimentos, sendo a frequência de portadores de 1 a cada 25 pessoas (Welsh *et al.*, 2001). A incidência da doença em diferentes países pode ser observada na tabela 1.1.

**Tabela 1.1. Incidência da fibrose cística em diferentes populações** (adaptado de Welsh *et al.*, 2001).

País	Incidência (nascidos vivos)
França	1 em 1.800
Estados Unidos	1 em 1.900 a 1 em 3.700
Itália	1 em 2.000
Austrália	1 em 2.450
Alemanha	1 em 3.300
Israel	1 em 5.000
África do Sul	1 em 6.500
Japão	1 em 323.000

A incidência da FC varia entre as diferentes regiões do Brasil devido à heterogeneidade da população brasileira. No Rio Grande do Sul, a estimativa da incidência da FC é de 1 em 1.587 indivíduos e é semelhante à encontrada no sul da Europa (Raskin *et al.*, 2008).

A FC é causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrânica da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - *CFTR*) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989), levando à perda de função da proteína CFTR, que em condições normais atua como um canal de Cl<sup>-</sup>.

Os órgãos e tecidos envolvidos na FC são formados por epitélio, que apresenta transporte anormal de eletrólitos através da membrana celular apical. Esse desequilíbrio eletrolítico contribui para a patogênese da doença, levando à formação de secreções espessas nos órgãos e sistemas. Assim, a expressão clínica da doença é muito variada, ocorrendo o comprometimento de diversos sistemas corporais (Welsh *et al.*, 2001).

A FC foi descrita por Andersen em 1938 como “fibrose cística do pâncreas” e o prognóstico da doença era fatal nos primeiros anos de vida. Ao longo dos anos, o avanço no conhecimento sobre a fisiopatologia da doença tornou cada vez maior a sobrevivência dos pacientes e dados do registro norte-americano mostram que a idade mediana de sobrevivência é de 36,5 anos atualmente (Dalcin e Abreu e Silva, 2008).

### **1.1.1. Manifestações clínicas**

A FC apresenta-se como uma doença multissistêmica, caracterizada por obstrução crônica das vias aéreas e infecções persistentes, insuficiência pancreática exócrina, cirrose biliar multifocal, problemas de motilidade intestinal, infertilidade masculina e elevados níveis de eletrólitos no suor (Welsh *et al.*, 2001).

Aproximadamente 10% dos pacientes com FC têm manifestações clínicas somente em um dos órgãos e este fenótipo incompleto é chamado de FC atípica. Estes pacientes apresentam complicações tais como asma, bronquite crônica, pancreatite, ausência congênita bilateral de vasos deferentes com azoospermia (ausência completa de espermatozoides no sêmen) e pólipos nasais (Welsh *et al.*, 2001; Groman *et al.*, 2005).

#### *A. Trato respiratório*

A FC afeta predominantemente as vias aéreas, sendo que complicações pulmonares são a principal causa de morbidade e mortalidade. Tosse e produção de escarro são manifestações clínicas comuns e muitos pacientes também apresentam pólipos nasais e sinusite. O curso clínico dos pacientes com FC é caracterizado por declínio progressivo da função pulmonar, levando à falência pulmonar e morte ou ao transplante pulmonar (Welsh *et al.*, 2001).

A doença pulmonar na FC origina-se de um transporte iônico alterado através do epitélio pulmonar, pois o canal CFTR não está funcional, com consequente falha na hidratação apropriada das secreções das vias aéreas. O volume reduzido de líquido na superfície das vias aéreas interfere na função ciliar, reduzindo o fluxo e o transporte do muco. Desta forma, densas placas de muco se aderem à superfície do epitélio pulmonar e bactérias presentes nesta camada de muco não podem ser eliminadas normalmente, contribuindo para a infecção pulmonar (Chmiel e Davis, 2003).

Além disso, a diminuição das defesas nos pulmões permite o estabelecimento de bronquite bacteriana crônica, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, acompanhada por intensa inflamação e destruição das vias aéreas. A infecção primária é causada por *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* e conforme a doença progride, *P. aeruginosa* se torna o isolado mais prevalente (Welsh *et al.*, 2001).

Os longos períodos de efeitos deletérios ocasionados pela intensa resposta inflamatória dos pacientes, ao invés dos danos causados diretamente pela colonização bacteriana, são a principal causa da deterioração progressiva da função pulmonar na FC (Chmiel e Davis, 2003).

A doença pulmonar é o aspecto mais variável no fenótipo da FC. Fatores como a idade do paciente na primeira infecção com patógenos bacterianos, grau de bronquiectasia (dilatação dos brônquios) e taxa de declínio pulmonar contribuem para a variação total da doença pulmonar entre os pacientes (Cutting, 2005).

### *B. Pâncreas*

O pâncreas exócrino é responsável pela secreção de fluidos pancreáticos alcalinos e pela síntese e liberação de enzimas digestivas. O epitélio do ducto pancreático é o local onde ocorre a secreção de bicarbonato e água e onde as células acinares sintetizam, estocam e secretam enzimas (Welsh *et al.*, 2001). A função do canal CFTR na secreção pancreática exócrina é baseada no fato de que este canal está localizado na membrana apical das células epiteliais do ducto proximal (Ntimbane *et al.*, 2008).

Aproximadamente 90% dos pacientes com FC apresentam produção deficiente de enzimas digestivas pelo pâncreas, resultando em insuficiência pancreática exócrina (Rowntree e Harris, 2003). Nestes pacientes, a perda da função de CFTR leva ao aumento da viscosidade e à redução da alcalinização das secreções pancreáticas acinares. Ocorre,

então, obstrução dos ductos pancreáticos pela secreção espessa, levando a uma redução no conteúdo de água e bicarbonato e a uma alta concentração de proteínas no suco pancreático. As enzimas digestivas são retidas nos ductos pancreáticos e são ativadas prematuramente, promovendo destruição do tecido e fibrose pancreática. Deste modo, a perda de função das estruturas do pâncreas reduz o conteúdo enzimático no fluido duodenal, com consequente má digestão de lipídios e proteínas. Essa má digestão ocasiona baixo ganho de peso corporal, contribui para o atraso no crescimento dos pacientes, leva à deficiência de antioxidantes lipossolúveis (vitaminas e carotenóides) e à deficiência de ácidos graxos essenciais (Welsh *et al.*, 2001; Peretti *et al.*, 2005; Ntimbane *et al.*, 2008).

Pacientes com FC têm uma alta probabilidade de desenvolver um quadro clínico de *diabetes mellitus* e um dos fatores relacionados é a perda de função das células beta com progressiva fibrose das ilhotas de Langerhans (Ntimbane *et al.*, 2008).

A pancreatite recorrente é outra complicação da FC, que ocorre geralmente em pacientes diagnosticados na idade adulta. Esses pacientes apresentam sintomas intermediários de FC, ou seja, mantêm a função pancreática exócrina e não apresentaram manifestações pulmonares, mas demonstram anormalidade no transporte iônico no epitélio nasal (Durno *et al.*, 2002).

### *C. Trato gastrointestinal*

A principal manifestação no trato gastrointestinal é a dilatação e hiperplasia das glândulas submucosas ao longo do intestino grosso e delgado, associado com o acúmulo de secreções eosinofílicas no lúmen dessas estruturas (Welsh *et al.*, 2001).

Pacientes com FC que apresentam insuficiência pancreática são predispostos à obstrução parcial ou incompleta do trato gastrointestinal. O íleo meconial é uma forma de obstrução intestinal observada no período neonatal, em que o mecônio contém grande quantidade de proteína tornando-se extremamente espesso, e ocorre em 13 a 20% dos pacientes com FC. Os pacientes adultos podem apresentar a síndrome de obstrução intestinal distal, uma obstrução que ocorre na porção terminal do íleo e está associada com conteúdo intestinal parcialmente digerido (Blackman *et al.*, 2006).

#### *D. Doença hepatobiliar*

A doença hepatobiliar na FC afeta primariamente as células epiteliais dos ductos biliares ao invés dos hepatócitos. A perda de efluxo de  $\text{Cl}^-$  leva a uma alteração na composição e na hidratação da bile, causando sedimentação de material eosinofílico nos ductos biliares com inflamação crônica secundária. Essas manifestações podem culminar em cirrose hepática (Welsh *et al.*, 2001).

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

#### *E. Glândulas sudoríparas*

A alteração mais consistente na FC é a elevada concentração de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  no suor produzido pelas glândulas sudoríparas écrinas. Esta anomalia está presente ao nascimento e ao longo de toda a vida do paciente (Welsh *et al.*, 2001).

Em condições normais, o suor é inicialmente isotônico e, ao se deslocar através do ducto glandular impermeável à água,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são reabsorvidos resultando em um suor hipotônico. O  $\text{Cl}^-$  é transportado do lúmen do ducto para o interior das células pelo canal iônico CFTR e o  $\text{Na}^+$  é transportado através de um canal regulado por CFTR (Mishra *et al.*, 2005).

Em pacientes com FC, as glândulas sudoríparas não apresentam anormalidade histológica, porém o canal CFTR não está funcional e, assim,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  não são reabsorvidos e o suor apresenta alta concentração de íons. A perda excessiva de água e eletrólitos pode levar a colapso cardiovascular e, além disso, pode resultar em desidratação hipoclorêmica ou alcalose metabólica hipoclorêmica (Welsh *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2005).

#### *F. Trato genitourinário*

Aproximadamente 99% dos homens com FC são inférteis devido à azoospermia atribuída à ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD – *congenital bilateral absence of the vas deferens*) e a infertilidade pode ser a manifestação inicial para alguns homens com a forma intermediária da doença. Na maioria dos casos, a

espermatogênese não está comprometida, porém as alterações obstrutivas não permitem que os espermatozoides cheguem à uretra (Welsh *et al.*, 2001; Jarzabek *et al.*, 2004).

A fertilidade reduzida também é observada em mulheres com FC, mas suas causas ainda não foram totalmente elucidadas. A hipótese proeminente para o decréscimo da fertilidade é o muco cervical espesso, que pode criar uma barreira à passagem dos espermatozoides. Além disso, mulheres fibrocísticas também possuem órgãos reprodutivos com tamanho reduzido e ciclos menstruais anormais, indicando que a fertilidade reduzida tem causa multifatorial (Hodges *et al.*, 2008). Puberdade atrasada e amenorreia também são comuns em mulheres com FC, devido, principalmente, ao peso corporal reduzido (Jarzabek *et al.*, 2004).

### **1.1.2. Gene *CFTR***

Em 1989, o gene responsável pela FC foi identificado por técnicas de clonagem posicional e localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31). O gene, denominado *CFTR*, compreende aproximadamente 190 kb de DNA genômico e está dividido em 27 éxons. Este gene é transcrito em um mRNA maduro de 6,5 kb, que é traduzido em uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, com peso molecular de 168 kDa (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Análises da região promotora do gene *CFTR* revelaram um alto conteúdo GC, inexistência da sequência consenso caixa TATA, múltiplos sítios de início de transcrição tecido-específicos e muitos sítios com potencial para ligação aos fatores de transcrição Sp1 e AP-1 (McCarthy e Harris, 2005).

O gene *CFTR* apresenta um padrão de expressão altamente regulado temporal e espacialmente. Análises dos níveis de mRNA por hibridização *in situ* demonstraram que o *CFTR* é altamente expresso no epitélio do ducto pancreático e no epitélio intestinal. Além disso, os padrões de expressão de *CFTR* no feto são mantidos após o nascimento, exceto no sistema respiratório, em que altos níveis de expressão são encontrados nos pulmões de fetos em contraposição à relativa baixa expressão detectada em pulmões de adultos (McCarthy e Harris, 2005).



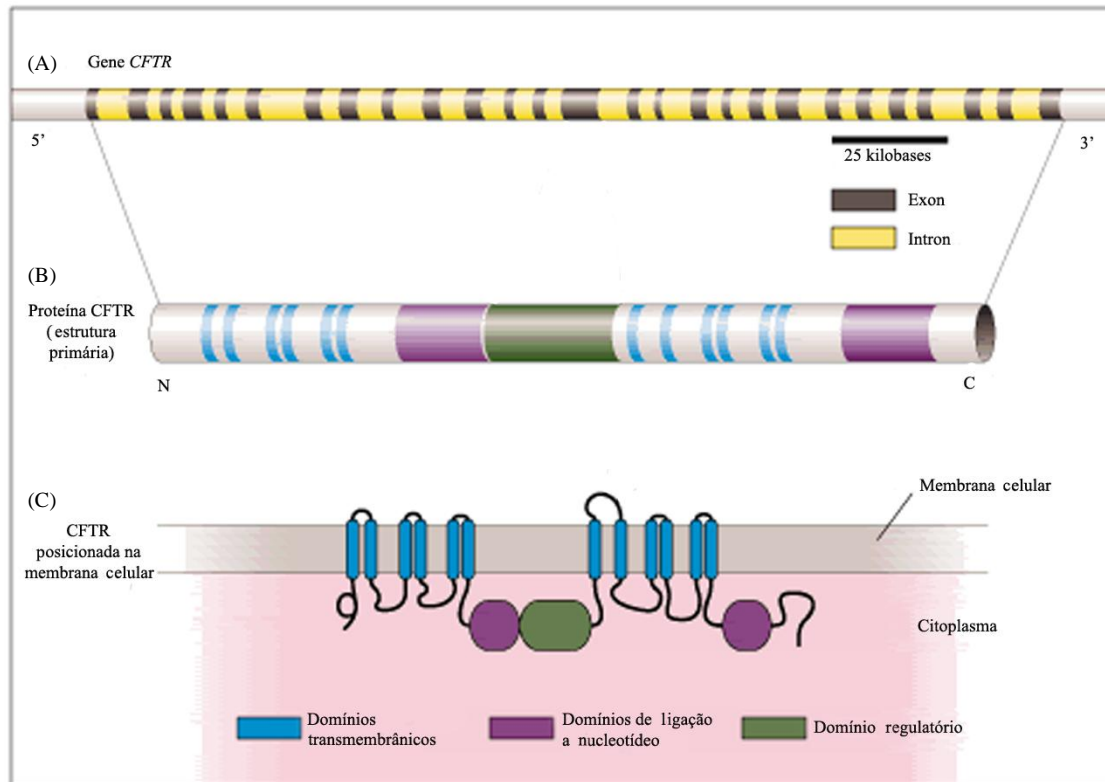
A expressão de *CFTR* em células epiteliais está bem descrita e a função do CFTR nestas células está relacionada à fisiopatologia da FC. Porém, recentemente, a expressão de *CFTR* foi descrita em células neuronais do hipotálamo, fornecendo uma possível explicação para alguns sintomas neurológicos encontrados em pacientes com FC (Guo *et al.*, 2009).

### 1.1.3. Proteína CFTR

O CFTR é uma glicoproteína, integrante da família de transportadores de membrana acoplados a ATP (ABC – *ATP-binding cassette*), que se localiza na membrana apical de células epiteliais das vias aéreas, do intestino, dos tecidos reprodutivos e das glândulas exócrinas. O CFTR funciona como um canal de Cl<sup>-</sup> regulado por cAMP, responsável pelo transporte transepitelial de íons e água (Li e Naren, 2005).

O CFTR é composto por dois domínios transmembrânicos hidrofóbicos (MSD – *membrane-spanning domain*), cada um com 6 subunidades, dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBD – *nucleotide binding domains*) e um domínio regulatório citoplasmático que contém múltiplos sítios-alvo para fosforilação por proteínas cinases (figura 1.1). As caudas amino e carboxi-terminal são orientadas para o citoplasma e atuam como mediadores da interação entre CFTR e uma ampla variedade de proteínas ligantes (Akabas, 2000; Li e Naren, 2005).

As subunidades dos domínios MSDs contribuem para a formação do poro do canal de Cl<sup>-</sup>, uma vez que mutações em sítios específicos dentro dos MSDs alteram sua seletividade a ânions. Os domínios NBD são responsáveis pela ligação e pela hidrólise de ATP e fornecem a energia necessária para a atividade do canal. O domínio regulatório modula a atividade de CFTR e pode ter um efeito inibitório ou estimulatório (Akabas, 2000; Welsh *et al.*, 2001).



**Figura 1.1. O gene *CFTR* e a proteína *CFTR*.** (A) Diagrama esquemático do gene *CFTR*, composto por 27 éxons. (B) Estrutura primária da proteína *CFTR* e (C) sua posição na membrana plasmática (adaptado de Welsh *et al.*, 2001).

Muitas células epiteliais regulam a secreção de  $\text{Cl}^-$  por modular a atividade do canal *CFTR* e por controlar o número de canais *CFTR* na membrana (Guggino e Stanton, 2006). A atividade do *CFTR* pode ser modulada através de diferentes mecanismos, incluindo os que envolvem fosforilação e defosforilação. A ativação do canal de  $\text{Cl}^-$  parece ocorrer através de diferentes passos. Primeiramente, o domínio regulatório se torna fosforilado por uma proteína cinase dependente de cAMP (PKA). Em seguida, o ATP intracelular se liga e é hidrolisado pelo NBD1 e assim o canal se abre e os íons  $\text{Cl}^-$  são transportados. A ligação e hidrólise de ATP pelo NBD2 leva ao fechamento do canal (Gadsby *et al.*, 2006).

Além de funcionar como um canal de  $\text{Cl}^-$ , o *CFTR* também age como um regulador de condutância, exercendo influências modulatórias sobre outros canais iônicos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), sobre o transporte de proteínas e sobre processos como mecanismos de liberação de ATP, regulação da secreção de bicarbonato, produção de óxido nítrico, entre outros (Guggino e Stanton, 2006).

O CFTR corregula o transporte de Na<sup>+</sup> através da interação com o canal de sódio epitelial (ENaC), sendo que o CFTR inibe o transporte de Na<sup>+</sup> pelo ENaC (exceto nas glândulas sudoríparas), enquanto o ENaC ativa o CFTR. Esta interação entre CFTR e ENaC é biologicamente relevante porque o balanço entre a secreção de Cl<sup>-</sup> mediada pelo CFTR e a reabsorção de Na<sup>+</sup> mediada pelo ENaC regulam a quantidade de sais e água nos fluidos encontrados na superfície celular de alguns tecidos (Guggino e Stanton, 2006).

O CFTR também pode funcionar como um neuromodulador e sinalizador celular, mediando o fluxo de glutathione através da hidrólise de ATP, além de ser importante para a regulação da reciclagem de membrana dependente de cAMP, indicando que mutações em *CFTR* podem induzir disfunções no sistema nervoso central (Guo *et al.*, 2009).

#### **1.1.4. Mutações no gene *CFTR***

Até o momento, mais de 1.470 mutações e mais de 200 polimorfismos já foram identificados ao longo de todo o gene *CFTR* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Existem, no entanto, regiões do gene em que as mutações são mais comuns, como as que codificam os domínios NBDs e o domínio regulatório (Rowntree e Harris, 2003). A maior parte das alterações encontradas no gene *CFTR* envolve um ou poucos nucleotídeos, sendo que 41,6% são mutações que causam substituição de aminoácido, enquanto grandes deleções ou inserções (rearranjos genômicos) representam aproximadamente 3% das alterações (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

A mutação F508del, tradicionalmente conhecida como  $\Delta$ F508, é a mais frequente entre os pacientes de FC, estando presente em aproximadamente 66% dos alelos em estatística mundial. A maioria das mutações restantes no gene *CFTR* são raras, com apenas quatro (G542X, G551D, N1303K e W1282X) apresentando frequências acima de 1% (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

A frequência e a distribuição das mutações no *CFTR* variam de acordo com a origem étnica dos pacientes com FC. Por exemplo, a frequência alélica de F508del apresenta um gradiente ao longo da Europa, variando de 24,5% na Turquia a 90% na Dinamarca. Além disso, algumas mutações são específicas ou apresentam frequências elevadas em determinados grupos étnicos, como a mutação W1282X em judeus Ashkenazi

e a 3120+1G>A em africanos (Bobadilla *et al.*, 2002). Essas variações são, provavelmente, devido ao efeito fundador durante a migração e estabelecimento de alguns grupos em diferentes áreas (Rowntree e Harris, 2003).

A população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo, com uma alta taxa de miscigenação. Uma das consequências deste fato é a grande heterogeneidade alélica do gene *CFTR*, sendo que a frequência das mutações varia de estado para estado. A mutação F508del apresenta, nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, frequências entre 45,5 e 50% e, no Rio de Janeiro e Pará, frequências de 28,4 e 22,7% respectivamente (Faucz *et al.*, 2010). No Rio Grande do Sul, em um estudo realizado previamente pelo grupo (Streit *et al.*, 2003), a mutação F508del foi encontrada em 48,7% dos alelos (tabela 1.2).

**Tabela 1.2. Mutações mais comuns no gene *CFTR*.**

<b>Mutação</b>	<b>Frequência em euro- descendentes (%) *</b>	<b>Frequência no Rio Grande do Sul, Brasil (%) **</b>
<b>F508del</b>	66,0	48,7
<b>G542X</b>	2,4	3,2
<b>G551D</b>	1,6	Não encontrada
<b>N1303K</b>	1,3	Não encontrada
<b>W1282X</b>	1,2	0,7
<b>R553X</b>	0,7	0,7

\* <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>; \*\* Streit *et al.*, 2003.

As mutações no gene *CFTR* podem ser classificadas em diferentes grupos, de acordo com os mecanismos pelos quais interrompem a função de CFTR (figura 1.2):

*Classe I – Mutações que inibem ou reduzem a produção da proteína*

As mutações de classe I podem criar um códon de terminação prematuro (*nonsense mutations*), deslocar a fase de leitura ou alterar o padrão de *splicing*, inibindo a síntese da

proteína estável ou produzindo baixos níveis da proteína madura (Rowntree e Harris, 2003).

As mutações G542X e W1282X são as representantes mais comuns desta classe, estando relacionadas aos fenótipos mais graves de FC, uma vez que a proteína CFTR não é sintetizada corretamente. Proteínas truncadas geralmente são instáveis, sendo reconhecidas por chaperonas no retículo endoplasmático e degradadas rapidamente (Rowntree e Harris, 2003). A degradação do mRNA mediada pela criação de códon de terminação prematuro (NMD - *nonsense mediated decay*) também está relacionada a mutações de classe I, porém a eficiência do processo de NMD é variável entre os pacientes com FC (Linde *et al.*, 2007).

Esta classe também inclui fenótipos menos graves ou intermediários, que ocorrem devido a variações de sequência que alteram o padrão de *splicing*, produzindo baixos níveis da proteína CFTR funcional. Um exemplo é o polimorfismo de número de repetições (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> na junção íntron 8 - éxon 9. Mutações na região promotora têm efeito semelhante, por reduzir os níveis de transcrição (Rowntree e Harris, 2003).

O *splicing* alternativo é um processo regulado, que aumenta a diversidade de mRNA maduros correspondentes a um gene. Porém, ocasionalmente, éxons constitutivos também podem ser removidos devido à presença de sítios de *splicing* com eficiência reduzida e o éxon 9 do gene *CFTR* é um exemplo deste processo. Entre o sítio de ramificação e o sítio de processamento 3' de *splicing* do íntron 8 existe uma região polimórfica com número variável de repetições TG seguida imediatamente por uma repetição de timidinas, conhecida como polimorfismo (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub>. Nesta região podem existir as formas alélicas contendo 5, 7 ou 9 timidinas, sendo que transcritos provenientes de alelos com 5T têm altos níveis de remoção do éxon 9. O número de repetições TG pode variar de 10 a 13 e o tamanho desta repetição influencia a penetrância dos alelos contendo 5T. Sequências TG com 12 ou 13 repetições, quando em *cis* com a repetição 5T, contribuem para um aumento dos níveis de remoção do éxon 9. O mRNA sem o éxon 9 codifica uma proteína com dobramento incorreto e, assim, a variante alélica contendo 5T pode estar relacionada ao aumento da gravidade do fenótipo da FC, principalmente se associada com 12 ou 13 TG (Hefferon *et al.*, 2002).

### *Classe II – Mutações que afetam o processamento da proteína*

Mutações desta classe não permitem que a proteína CFTR seja processada corretamente, impedindo-a de alcançar a membrana celular para funcionar como um canal de Cl<sup>-</sup>. A principal representante desta classe é a mutação F508del e também estão incluídas outras mutações associadas a dobramento incorreto da proteína, como algumas que causam substituição de aminoácido (Rowntree e Harris, 2003).

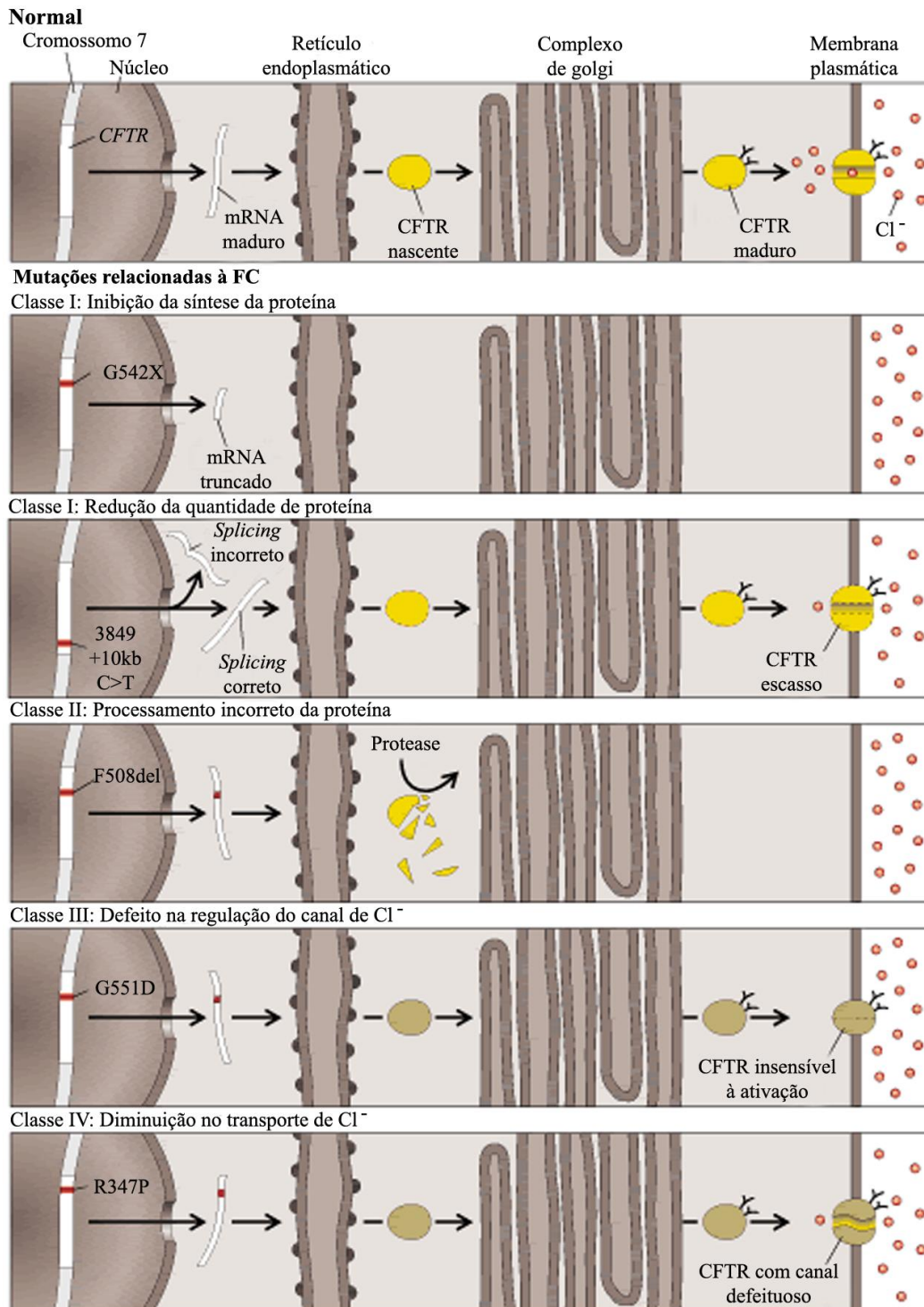
A F508del é uma deleção de 3 pb no éxon 10 do gene *CFTR*, que ocasiona a perda da fenilalanina na posição 508 da proteína. A proteína CFTR com F508del é sintetizada, mas não é transportada para a membrana celular por apresentar dobramento incorreto. Porém, estudos *in vivo* sugerem que uma quantidade residual de CFTR consegue alcançar a membrana plasmática em pacientes homocigotos F508del (Rowntree e Harris, 2003).

### *Classe III – Mutações que afetam a regulação do canal de Cl<sup>-</sup>*

Mutações de classe III produzem proteínas CFTR que são transportadas para a membrana celular, mas não respondem à estimulação por cAMP (Rowntree e Harris, 2003). As mutações desta classe geralmente estão presentes nos NBD, interferindo na interação desses domínios com ATP intracelular e, conseqüentemente, impedindo a regulação correta da abertura do canal de Cl<sup>-</sup>. Algumas mutações interrompem fortemente a função do CFTR, como a G551D, e estão associadas aos fenótipos graves da FC, e outras, como a A455E, causam uma diminuição moderada da função de CFTR e são associadas a fenótipos leves (Welsh *et al.*, 2001).

### *Classe IV – Mutações que afetam o transporte de Cl<sup>-</sup>*

Muitas mutações foram identificadas nos domínios transmembrânicos do CFTR, em que o gene codifica uma proteína que é transportada corretamente para a membrana celular e responde a estímulos, mas gera um fluxo reduzido de íons Cl<sup>-</sup>. Alguns exemplos incluem mutações no MSD1, como a R117H, a R334W e a R347P, estando associadas ao fenótipo intermediário de FC. A mutação D1152H, localizada na alça intracitoplasmática que conecta o MSD2 ao NBD2, reduz significativamente o fluxo de Cl<sup>-</sup> estimulado por cAMP e também está incluída na classe IV (Rowntree e Harris, 2003).



**Figura 1.2. Mecanismos pelos quais mutações impedem o funcionamento normal do CFTR.** Em condições normais, o gene *CFTR* é transcrito e traduzido em uma proteína que sofre modificações como dobramento e glicosilação e é transportada para a membrana celular via complexo de golgi. Entre as mutações relacionadas à FC, estão as de classe I, que inibem ou reduzem a produção da proteína, as de classe II, em que ocorre falha na maturação da proteína, as de classe III, em que o CFTR alcança a membrana celular, mas não responde à estimulação por cAMP, e as de classe IV, que afetam o transporte de Cl<sup>-</sup> através do poro do CFTR (adaptado de Mishra *et al.*, 2005).

### 1.1.5. Correlação genótipo-fenótipo

O fenótipo da FC é altamente heterogêneo, indicando uma complexa contribuição de diferentes fatores na determinação da gravidade da doença, como a presença de mutações no gene *CFTR* com diferentes efeitos na proteína, genes modificadores e efeitos ambientais (Welsh *et al.*, 2001; Rowntree e Harris, 2003). O atraso no diagnóstico, a disponibilidade e adesão ao tratamento, a exposição a poluentes do ar, bem como o tempo de infecção pulmonar podem ser considerados como fatores ambientais (Davies *et al.*, 2005).

As mutações denominadas graves, em que a proteína CFTR funcional está ausente, estão correlacionadas principalmente com insuficiência pancreática, início precoce dos sintomas, altos níveis de Cl<sup>-</sup> no suor e infertilidade masculina. As mutações intermediárias, cujo efeito é mais sutil na função da proteína ou permitem que uma pequena quantidade de CFTR funcional seja produzida, são geralmente associadas com suficiência pancreática, diagnóstico tardio, baixos níveis de Cl<sup>-</sup> no suor e dano pulmonar intermediário (Rowntree e Harris, 2003).

Poucas mutações no gene *CFTR* foram associadas à doença pulmonar na FC, já que este aspecto é altamente variável, mesmo entre irmãos que possuem o mesmo genótipo. Pacientes apresentando a mutação A455E, por exemplo, parecem ter uma menor taxa de declínio da função pulmonar e algumas mutações que afetam o *splicing* foram correlacionadas com um baixo risco de infecção com *P. aeruginosa*. Apesar dessas observações, existe um consenso de que o genótipo é pouco correlacionado com a gravidade da doença pulmonar (Cutting, 2005).

Em contraposição, o estado pancreático dos pacientes é altamente associado com o genótipo de *CFTR*. Pacientes com suficiência pancreática têm pelo menos uma mutação intermediária, enquanto pacientes com insuficiência pancreática são homozigotos ou heterozigotos compostos para duas mutações de efeito grave. As mutações R117H, R334W, R347P e A455E, por exemplo, são geralmente associadas com dano pancreático menos grave (Cutting, 2005).

O genótipo do *CFTR* também é correlacionado com o transporte iônico através do epitélio intestinal, porém a função do genótipo no desenvolvimento das complicações



intestinais em pacientes com FC ainda é pouco clara. A manifestação de íleo meconial parece ocorrer somente em pacientes com insuficiência pancreática (Cutting, 2005).

A doença hepática está altamente associada com o estado pancreático e, em alguns casos, com íleo meconial. Assim, pacientes com doença hepática tendem a apresentar mutações de efeito grave, que são altamente associadas à insuficiência pancreática (Cutting, 2005).

Até o momento, pelo menos um modificador da doença pulmonar foi identificado, o TGF $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor  $\beta$ 1*), um mediador de fibrose, em que uma variante alélica que leva à alta produção da proteína é associada com um pior estado pulmonar. Modelos recentes para a fisiopatologia da FC incluem elementos que contribuem para a remoção bacteriana anormal dos pulmões, para a infecção persistente, para a inflamação intensa e para o dano estrutural dos órgãos, e o TGF $\beta$ 1 participa desses processos. Muitos outros candidatos a modificadores vêm sendo estudados, como, por exemplo, MBL2 (*Mannose Binding Lectin 2*) e TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), porém os estudos são, em geral, de pequeno porte levando a resultados conflitantes (Accurso e Sontag, 2008; Collaco e Cutting, 2008).

#### **1.1.6. Diagnóstico**

O critério para diagnóstico da FC clássica inclui a presença de uma ou mais manifestações clínicas características – doença pulmonar crônica, insuficiência pancreática, azoospermia obstrutiva, anormalidades gastrointestinais e nutricionais – e evidência de disfunção no CFTR (tabela 1.3). O diagnóstico da FC atípica é difícil de ser estabelecido, pois as manifestações podem ocorrer em apenas um sistema e os testes laboratoriais podem ser normais ou duvidosos (Boeck *et al.*, 2006).

**Tabela 1.3. Critério para diagnóstico de FC** (adaptado de Rosenstein e Cutting, 1998).

<b>Achados clínicos compatíveis com fibrose cística</b>		<b>Evidência laboratorial de disfunção no CFTR</b>
Uma ou mais manifestações clínicas características		Teste do suor positivo
ou		ou
Triagem neonatal positiva	<b>mais</b>	Diferença de potencial nasal positiva
ou		ou
História familiar positiva		Duas mutações no gene <i>CFTR</i>

#### *1.1.6.1. Diagnóstico pré-sintomático*

##### a) Teste de triagem neonatal

O teste de triagem neonatal se baseia na dosagem quantitativa do tripsinogênio imunorreativo (IRT) e deve ser realizado na primeira semana de vida para apresentar maior valor diagnóstico. Os ácinos pancreáticos de crianças com FC são capazes de produzir tripsinogênio, precursor pancreático da tripsina. Porém, como seus ductos pancreáticos estão bloqueados, o tripsinogênio fica impedido de alcançar o intestino e ser convertido em tripsina, ocorrendo assim um aumento da concentração de tripsinogênio na corrente sanguínea (Mishra *et al.*, 2005; Boeck *et al.*, 2006).

Confirmação do diagnóstico é necessária através da realização de teste de suor e análise de mutações no gene *CFTR*, pois existe uma taxa elevada de resultados falsos positivos e possibilidade de falsos negativos. Quanto mais cedo for realizado o diagnóstico e iniciado o tratamento, melhor será o curso da doença e a função pulmonar em indivíduos com fibrose cística (Ross, 2008).

#### *1.1.6.2. Diagnóstico sintomático*

##### a) Análise bioquímica

O teste do suor é o teste laboratorial confirmatório mais utilizado em FC, visto que a concentração de Cl<sup>-</sup> no suor pode definir o diagnóstico em mais de 90% dos casos (Welsh

*et al.*, 2001). O teste envolve a coleta de suor pelo método de iontoforese estimulada por pilocarpina (Gibson e Cooke, 1959), com posterior determinação química da concentração de  $\text{Cl}^-$  por colorimetria, coulometria ou por eletrodo íon-seletivo. Para uma melhor acurácia, o teste deve ser realizado em crianças com pelo menos duas semanas de idade e peso acima de 2 quilogramas (Mishra *et al.*, 2005).

Os valores de referência para a concentração de  $\text{Cl}^-$  no suor em crianças são os descritos a seguir: valores até 39 mmol/L são considerados negativos, valores entre 40 e 59 mmol/L são intermediários (pode ser FC) e valores iguais ou maiores que 60 mmol/L são positivos para FC. A confirmação diagnóstica necessita de pelo menos dois exames alterados, colhidos em dias diferentes. Em adultos pode haver um aumento nessas faixas de valores e, assim, adultos saudáveis podem ocasionalmente apresentar concentrações maiores do que 60 mmol/L (Mishra *et al.*, 2005).

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

#### b) Análise molecular

A análise das mutações relacionadas à FC tem valor diagnóstico, auxiliando na avaliação clínica, e valor prognóstico e epidemiológico, identificando portadores de alelos para FC e permitindo a documentação de mutações raras no gene *CFTR*. A análise do DNA também é utilizada para esclarecer o diagnóstico de pacientes com FC atípica, que podem apresentar resultado intermediário nos testes bioquímicos (Welsh *et al.*, 2001; Lyon e Miller, 2003).

A confirmação do diagnóstico de FC ocorre através da detecção de duas mutações relacionadas à doença, sendo que os pacientes podem ser homocigotos (portadores de uma mesma mutação nos dois alelos do *CFTR*) ou heterocigotos compostos (com duas mutações diferentes em *CFTR*) (Boeck *et al.*, 2006). Em geral, mutações de perda da função do *CFTR* estão associadas com FC clássica, enquanto FC atípica está relacionada a

uma combinação de mutações que causam perda parcial da função do *CFTR* (Welsh *et al.*, 2001).

Alguns ensaios comerciais estão disponíveis para a busca de mutações no gene *CFTR*, porém a maioria detecta apenas 25 mutações, conforme recomendações do *American College of Medical Genetics* (ACMG). Estes ensaios podem atingir uma taxa de detecção superior a 95% em algumas populações, no entanto, a grande heterogeneidade das mutações no *CFTR* torna difícil a aplicação de um mesmo ensaio em diferentes populações e grupos étnicos (Grody *et al.*, 2001; Castellani *et al.*, 2008).

Assim, principalmente em populações miscigenadas, como a do Brasil, a busca mais abrangente de alterações na sequência de ambos os alelos de *CFTR* se faz necessária. Essa busca pode ser realizada através de métodos de triagem e também pelo sequenciamento da região codificante do gene (Boeck *et al.*, 2006).

### **1.1.7. Tratamento**

As dificuldades em diagnosticar indivíduos com FC, principalmente os que apresentam fenótipo incompleto, levam ao atraso no desenvolvimento de terapias eficazes. Atualmente, o tratamento de FC é direcionado para a prevenção e/ou correção das disfunções nos sistemas comprometidos e alívio dos sintomas. A prevenção é feita através do monitoramento nutricional, gastrointestinal e do estado pulmonar, para permitir o crescimento e desenvolvimento normal de crianças com a doença e melhorar a qualidade de vida na idade adulta (Welsh *et al.*, 2001).

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

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

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

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares da disfunção de *CFTR* e da patogênese da doença permitiu o desenvolvimento de metodologias farmacológicas para a correção do fenótipo da FC, enfatizando a importância da genotipagem de cada paciente durante o diagnóstico. Certos antibióticos da família dos aminoglicosídeos, como a gentamicina, por exemplo, são capazes de suprimir mutações que introduzem códons de terminação prematuros, permitindo a produção da proteína CFTR funcional. Muitos outros fármacos estão sendo estudados e novas drogas vêm sendo desenvolvidas para obter uma terapia efetiva, que contribua para a maior sobrevivência dos pacientes (Welsh *et al.*, 2001; Rowntree e Harris, 2003).

## 1.2. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A análise do gene *CFTR* pode ser realizada com a finalidade de fornecer o diagnóstico molecular de fibrose cística, diagnóstico pré-natal e teste de portadores, e muitas técnicas estão disponíveis para identificar alterações na sequência do gene *CFTR*. Estas metodologias laboratoriais podem ser divididas em dois grupos: técnicas que detectam variantes alélicas conhecidas (genotipagem) e técnicas que buscam por qualquer alteração em uma determinada região de interesse (trialogem) (Dequeker *et al.*, 2009).

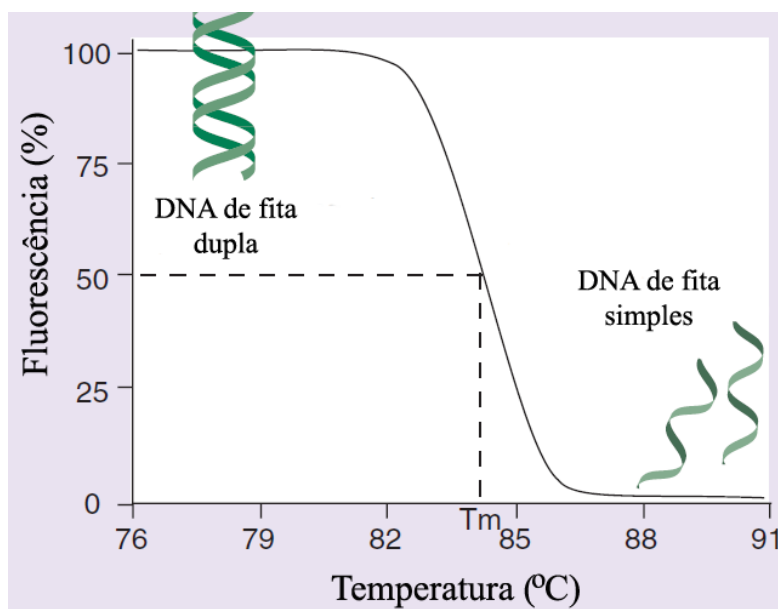
As técnicas de genotipagem mais utilizadas na análise do gene *CFTR* são análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), sistema de mutação refratário à amplificação (ARMS-PCR), ensaio qualitativo de PCR em tempo real (método TaqMan<sup>®</sup>, por exemplo), entre outras. Entre os métodos de triagem podem ser destacados a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), cromatografia líquida desnatante de alta performance (dHPLC) e, mais recentemente, análise de dissociação em alta resolução (HRM). O sequenciamento de DNA pode ser utilizado para confirmar as alterações encontradas pelos métodos de triagem ou ser usado diretamente para identificar as mutações. Os rearranjos no gene *CFTR* (grande deleções, inserções e duplicações) podem ser detectados, por exemplo, por amplificação múltipla dependente de ligação de sonda (MLPA) (Dequeker *et al.*, 2009).

Embora muitas técnicas para detecção de variações de sequência encontrem-se disponíveis, métodos que não precisam de processamento da amostra entre a amplificação por PCR e a análise do produto amplificado apresentam vantagens para o diagnóstico molecular, diminuindo o risco de contaminação, possibilitando a automação e, conseqüentemente, reduzindo o tempo entre a coleta de amostra e a obtenção do resultado. O método HRM apresenta estas vantagens e será descrito abaixo, uma vez que o objeto de estudo desta dissertação é a aplicação desta metodologia.

### 1.2.1. Análise de dissociação em alta resolução (HRM)

A análise de dissociação em alta resolução (*High Resolution Melting analysis* – HRM) é um método utilizado para detectar alterações na sequência do DNA. Esse método foi introduzido em 2002 através da colaboração entre a academia (Universidade de Utah, UT, EUA) e a indústria (Idaho Technology, UT, EUA) (Reed *et al.*, 2007).

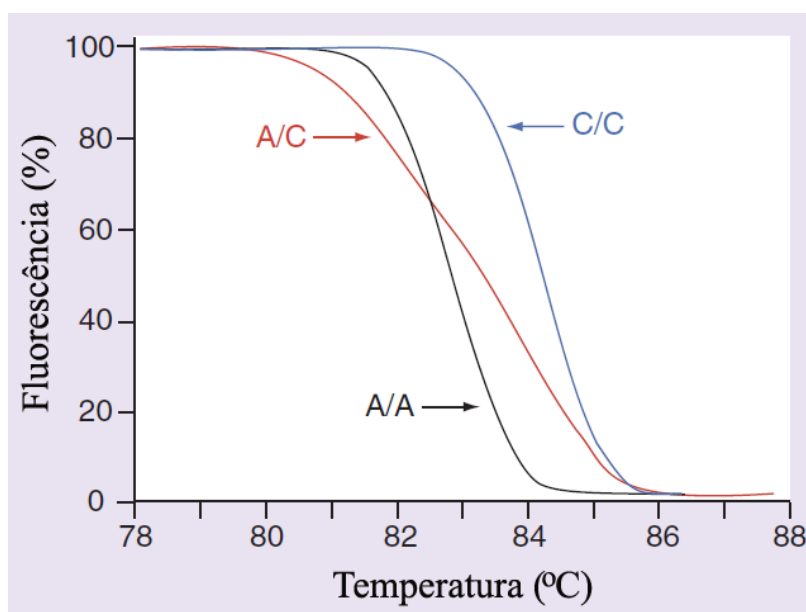
A análise por HRM não necessita processamento, adição de reagentes ou separação das amostras após a PCR, visto que um fluoróforo capaz de se intercalar ao DNA de dupla fita é adicionado na PCR antes da reação de amplificação. Após a amplificação do DNA, uma curva de dissociação é gerada e, para isso, a amostra é aquecida ao longo de um gradiente de temperatura, enquanto a fluorescência é continuamente coletada. Conforme a temperatura é elevada, a fluorescência decresce, refletindo a desnaturação do DNA em fitas simples. A partir da curva de dissociação, a temperatura de dissociação ( $T_m$ ) da amostra pode ser obtida, a qual é definida como a temperatura em que 50% de cada molécula de DNA está desnaturada (figura 1.3) (Reed *et al.*, 2007).



**Figura 1.3. Curva de dissociação do DNA.** Para construir a curva de dissociação, a amostra é aquecida e, enquanto a temperatura aumenta, a fluorescência diminui, devido à desnaturação do DNA em fitas simples. A temperatura de dissociação ( $T_m$ ) é a temperatura em que 50% de cada fragmento de DNA está desnaturado (adaptado de Reed *et al.*, 2007).

A obtenção de curvas de dissociação com alta resolução é possível devido à utilização de fluoróforos intercalantes saturantes, que não inibem a PCR mesmo presentes em altas concentrações, e de instrumentos com altas taxas de aquisição de dados (Reed *et al.*, 2007).

O perfil de dissociação de um produto de PCR depende de seu conteúdo GC, do comprimento do fragmento, da sequência de nucleotídeos e da heteroziguidade. A análise HRM é baseada na diferença entre a forma das curvas de dissociação e na diferença entre valores  $T_m$  das amostras. A  $T_m$  de um produto de PCR é uma medida conveniente, porém é apenas um ponto da curva de dissociação. Portanto, a forma da curva é mais informativa, sendo utilizada como indicador da presença de heterodúplixes formados a partir de DNA heterozigoto (figura 1.4) (Graham *et al.*, 2005).



**Figura 1.4. Curva de dissociação de amostras com diferentes genótipos.** As curvas de dissociação de três amostras com diferentes genótipos, obtidas a partir da amplificação por PCR da mesma região, podem ser discriminadas. Em preto, curva de uma amostra homozigota para o alelo selvagem (A/A); em azul, de uma amostra homozigota para o alelo mutante (C/C); e em vermelho, de uma amostra heterozigota (A/C) (adaptado de Reed *et al.*, 2007).

A análise por HRM é capaz de realizar genotipagem sem o uso de sondas, mesmo quando a mudança na sequência é de apenas um par de base. Esse método também pode



ser aplicado em análises de identidade de sequências (*sequence matching*), quando é necessário saber se duas sequências são iguais, independentemente do genótipo, em casos de transplantes e em casos forenses (Reed *et al.*, 2007).

HRM também é um método de triagem capaz de detectar alterações de ponto, pequenas inserções e pequenas deleções, porém deleções de genes e éxons inteiros não podem ser identificadas. A identificação de alterações no DNA por HRM é realizada através da observação da distorção que ocorre na curva de dissociação de amostras na forma de heterodúplixes, quando comparadas a amostras controle homocigotas. Apesar de ter sido elaborado para detectar heterocigotos, a análise HRM também é capaz de identificar diferenças entre homocigotos. As amostras que apresentam alteração na curva de dissociação devem ser submetidas a sequenciamento, para identificar a mutação ou o polimorfismo presente (Reed *et al.*, 2007).

Portanto, HRM é um método adequado para a detecção de alterações na sequência de DNA e apresenta vantagens, como facilidade de execução e rapidez na obtenção dos resultados.

### 1.3. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico molecular de uma doença genética pode melhorar o prognóstico dos pacientes, pois permite que terapias capazes de atuar na causa da doença sejam desenvolvidas. Além disso, o conhecimento das mutações relacionadas à doença presentes em uma família é uma informação importante durante o processo de aconselhamento genético, antes de uma possível gestação.

A análise molecular de FC realizada como rotina no nosso laboratório consiste, atualmente, na identificação das mutações F508del, G542X, G551D, R553X, W1282X e N1303K no gene *CFTR*, utilizando ensaios qualitativos de PCR em tempo real. Através desta metodologia é possível identificar 53,3% dos alelos relacionados à FC e, portanto, muitos pacientes permanecem com o genótipo incompleto ou desconhecido.

Metodologias para a busca de mutações podem ser utilizadas para aumentar o número de pacientes com genótipo definido. Métodos de varredura que sejam rápidos e passíveis de automação são úteis na análise molecular de genes longos e com grande heterogeneidade alélica, como é o caso do *CFTR*.

Recentemente, o método HRM foi desenvolvido e tem sido utilizado na busca de variações de sequência em diferentes genes, inclusive no *CFTR* (Reed *et al.*, 2007). A análise do gene *CFTR* por HRM apresenta uma sensibilidade de detecção de heterozigotos muito próxima a 100% segundo trabalhos da literatura (Montgomery *et al.*, 2007; Audrezet *et al.*, 2008). Desta forma, devido às potenciais vantagens dessa metodologia e a possibilidade de seu uso em programas de massa, essa metodologia foi escolhida para ser empregada no presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar variações de sequência (mutações ou polimorfismos) no gene *CFTR*, em pacientes com diagnóstico clínico de FC.

### 2.2. Objetivos específicos

- Implementar o método de análise de dissociação em alta resolução (HRM) para a detecção de alterações de sequência no gene *CFTR*;
- Pesquisar variações de sequência em 11 regiões codificantes do gene *CFTR* pelo método HRM, em pacientes com diagnóstico clínico de FC;
- Identificar as alterações de sequência (mutações ou polimorfismos) através de sequenciamento das regiões que apresentaram alteração pelo método HRM;
- Identificar variações de sequência de nucleotídeos no éxon 9 do gene *CFTR*, através de sequenciamento direto de DNA;
- Determinar o número de repetições  $(TG)_nT_m$  no sítio receptor de *splicing* do íntron 8 por sequenciamento direto de DNA.

### 3. ARTIGO

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de um manuscrito que será submetido para publicação na revista *Journal of Molecular Diagnostics*.

# **Identification of sequence variation in specific regions of *CFTR* gene in Brazilian patients with Cystic Fibrosis**

Mariana Fitarelli-Kiehl<sup>a,b</sup>; Hugo Bock<sup>a</sup>; Fernando Abreu e Silva<sup>c</sup>;

Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Serviço de Pneumologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

**Number of text pages:** 14

**Number of tables:** 2

**Number of figures:** 2

**Short running head:** *CFTR* mutation analysis by HRM in Brazil

**Grant numbers and sources of support:** CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and FIPE-HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

**Address to correspondence and reprint requests:**

Maria Luiza Saraiva-Pereira, PhD

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903 – Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 3359-8011

Fax: +55 51 3359-8010

e-mail: [mlpereira@hcpa.ufrgs.br](mailto:mlpereira@hcpa.ufrgs.br)

## ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disorder caused by mutations in *CFTR* gene where more than 1,600 sequence variants were identified. In heterogeneous populations, as the Brazilian population, number of different mutations in *CFTR* gene can be very large. The high allelic heterogeneity and *CFTR* extent can make molecular diagnosis of CF patients a hard task. So, the use of mutation scanning methods would be useful. The aim of this work was to identify allelic variants in coding *CFTR* regions of CF patients from south Brazil through high-resolution melting (HRM) analysis and DNA sequencing. Eleven exons and adjacent regions were analyzed by HRM, and 10 different sequence variants were detected (R75Q, R334W, F508del, 1717-1G>A, G542X, R553X, 1812-1G>A, A561E, G576A and N1303K). Besides, the L453X variant, previously unreported, was identified in *CFTR* gene of a CF patient through exon 9 sequencing. The polyvariant (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> region at intron 8 was characterized, and no patient carried the 5T allelic variant. We were able to identify 57.7% of CF alleles in 26 patients. Genotype was characterized in 26.9% of patients, and one *CFTR* allelic variant was detected in 61.6% individuals. Therefore, HRM analysis was a rapid and sensible single-tube technique for screening mutation in *CFTR* gene.

## INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in euro-descendants with an estimated incidence of 1 case in each 2,500 live-births. CF involves multiple organ systems and is characterized mainly by progressive obstructive pulmonary disease, pancreatic insufficiency, high levels of electrolytes in sweat, and male infertility (1). CF is caused by mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene (2-4). *CFTR* encodes a 1,480 amino acid protein that functions as a cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent chloride channel, playing an important role in chloride transport and sodium and water balance across apical epithelial surfaces (5).

Up to date, more than 1,600 sequence variations have been reported in the *CFTR* gene (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). F508del mutation, a deletion of a phenylalanine residue at position 508 (4), is the most common CF causing mutation worldwide and accounts for approximately 66% of mutant alleles in CF patients. In addition, four other mutations namely G542X, G551D, W1282X, and N1303K are found in frequencies above 1 percent (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Another relevant region for phenotypic manifestations is a polyvariant (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> region (TG dinucleotide repeats immediately followed by a T tract) at intron 8, in which a short polythymidine tract (5T) modulated by (TG)<sub>n</sub> repeat, increases levels of exon 9 skipping (6).

Frequency and distribution of *CFTR* mutations differ remarkably across ethnic groups, and in mixed populations the number of different mutations is very large (1). The Brazilian population is the result of ethnic admixture of Europeans, Africans and Amerindians. Therefore a high allelic heterogeneity is observed in the *CFTR* gene (7).



Frequency of mutations varies from region to region within Brazil and mutant alleles carrying F508del ranges from 48.7% to 22.7% (8,9).

Therefore, detection of disease-causing mutations can be improved by introducing alternative scanning techniques to identify *CFTR* variants. Recently, high-resolution DNA melting analysis (HRM) was introduced as a simple method for genotyping and mutation scanning (10). HRM is a closed-tube method that requires no post-PCR processing of the samples. After PCR amplification, melting curves are generated by monitoring the fluorescence of a saturating dye that does not inhibit PCR over the temperature range. Homozygous, heterozygous and wild-type samples are distinguished according to their melting profile and melting temperatures ( $T_m$ ) (11).

The objectives of this study were (1) to investigate sequence variants in 11 regions of the *CFTR* gene from patients with clinical diagnosis of CF from South Brazil through HRM analysis followed by DNA sequencing when melting profile and/or melting temperature was different from a normal sample, and (2) to analyze the polyvariant (TG)<sub>n</sub> $T_m$  region at intron 8 and to identify sequence variants at exon 9 by direct DNA sequencing.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

We have included in this study 26 CF patients clinically diagnosed by the Pneumology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Rio Grande do Sul state, Brazil. The diagnosis of CF was based upon compatible clinical findings with abnormally high sweat electrolyte concentrations (>60 mmol/L). Samples were previously tested for six common mutations in the *CFTR* gene (F508del, G542X, G551D, R553X, W1282X and N1303K) by real-time PCR through TaqMan<sup>®</sup> system (Applied Biosystems, Foster City, USA), and individuals selected for this study presented one or none of these mutations. The research protocol was approved by our local ethic committee.

### DNA samples

Peripheral blood sample (5 mL) was collected in a tube containing EDTA and genomic DNA was isolated by salting-out method as previously described (12). DNA was quantified by fluorometric system Quant-iT<sup>™</sup> ds DNA BR Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) using the Qubit<sup>™</sup> fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA). DNA samples were diluted to a concentration of 10 ng/μL.

### HRM assay

Eleven regions of *CFTR* gene (exons 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 20, 21 and their adjacent intron/exon junctions) were included to be analyzed by HRM. These regions show high mutation density according to Cystic Fibrosis Mutation Database - CFMD (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Oligonucleotide primers used for amplifying these

regions have been published previously (13). HRM analysis was performed according to the manufacturer's recommendations in 0.1 mL 96-well optical plates in the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). The reaction mixture was set up in a final volume of 20  $\mu$ L containing 20 ng of DNA, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 62.5  $\mu$ M of each dNTP, 0.3  $\mu$ M of each primer, 1.5  $\mu$ M SYTO<sup>®</sup>9 dye (Invitrogen, Carlsbad, USA), and 1 U AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA). Cycling and melting conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 20 seconds, followed by dissociation stage at 95°C for 15 seconds, 1 minute at 50°C, 15 seconds at 95°C and 15 seconds at 60°C. Melting curves were analyzed with High Resolution Melting Software v.2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Samples were tested in duplicate. Two wild-type samples were used as negative controls in the HRM analysis of each exon. We have also used six positive controls, distributed as follows: a heterozygous for F508del (exon 10), a homozygous for G542X (exon 11), a heterozygous for G542X, a heterozygous for R553X (exon 11), a heterozygous for W1282X (exon 20), and a heterozygous for N1303K (exon 21).

### **PCR amplification and direct DNA sequencing**

Samples from CF patients showing abnormal HRM profiles and *CFTR* exon 9 and flanking regions of all samples were submitted to PCR amplification and direct DNA sequencing. *CFTR* exon 9 and adjacent regions were not submitted to HRM analysis due to the presence of (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> polymorphism which would mask other sequence variation within this fragment. Specific *CFTR* regions that were previously included in HRM analysis were amplified by PCR using the same primers. For amplification of exon 9, primers were

designed using Primer Express<sup>®</sup> Software v.3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). These sequences are CFS9F (forward) 5'-CCATGTGCTTTTCAAATAATTGTACA-3' and CFS9R (reverse) 5'-CTCCAAAATACCTTCCAGCACTAC-3'. *CFTR* regions were amplified in a total volume of 25  $\mu$ L containing 50 ng of DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer, and 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Amplification was performed in Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) and cycling conditions for all reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 10 minutes, then 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds, followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under a UV transilluminator.

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

## RESULTS

We have observed successful HRM analyses results in all *CFTR* regions included in this work. We have observed normal melting profiles in exons 4, 5, 8, 18, and 20 while abnormal melting profiles were observed in exons 3, 7, 10, 11, 12, and 21 (Figure 1). We have employed two wild-type samples throughout this study as negative controls and six samples that carry specific mutations as positive controls for specific HRM analyses.

Samples with same genotype were clustered together, and heterozygous samples were identified by different shape from those of common homozygous cluster. Samples that show melting curve profiles different from wild-type samples were submitted to direct DNA sequencing from forward and reverse primers in order to characterize the sequence variations.

In exon 3, R75Q variant was identified in two samples (Figure 1.A). In the exon 7, the R334W mutation was found in one sample (Figure 1.B). In the exon 10, F508del was detected in 16 samples (Figure 1.C). The F508del in these 16 samples was previously detected by qualitative assay real-time PCR. We have also confirmed the presence of this mutation in the positive control (sample heterozygous for F508del).

In exon 11, five samples showed abnormal melting curve profiles. Two samples were identified with R553X mutation, one sample with G542X mutation, one sample with 1717-1G>A mutation, and one sample with G542X and 1717-1G>A mutations (Figure 1.D). R553X and G542X mutations were previously detected in these samples by real-time PCR. We have also confirmed the identification of positive control samples in this region of *CFTR* (a sample homozygous for G542X, a heterozygous for G542X, and a heterozygous for R553X).

In exon 12, one sample was identified with 1812-1G>A mutation, one sample with A561E mutation, and one sample with G576A mutation (Figure 1.E). In exon 21, the N1303K mutation was detected in one sample and in the positive control (heterozygous N1303K) (Figure 1.F). The N1303K was previously identified by real-time PCR in this sample. These results are summarized in table 1.

Direct DNA sequencing of exon 9 revealed one novel variant in one allele of a CF patient. This allele was characterized by T to A substitution at nucleotide 1940 (Figure 2) that is responsible by the replacement of leucine to stop codon at residue 453. This nonsense sequence variation, named L453X (p.Leu453X or c.1490T>A), was confirmed by sequencing a new PCR amplicon from both ends.

Sequencing of exon 9 and adjacent regions also allowed the characterization of the polyvariant (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> region in the intron 8. Among 52 *CFTR* alleles of 26 CF patients, 20 alleles (38.5%) carried (TG)<sub>10</sub>T<sub>9</sub>, 19 (36.5%) carry (TG)<sub>11</sub>T<sub>7</sub>, 12 (23.1%) carry (TG)<sub>10</sub>T<sub>7</sub>, and 1 (1.9%) carry (TG)<sub>12</sub>T<sub>7</sub> variant.

Combining HRM analysis and direct DNA sequencing, we were able to establish the genotypes of 7 out of 26 (26.9%) CF patients included in this study. One mutation was determined in 16 CF patients and 3 patient remain with no mutation detected.

Results of patients genotypes and (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> polyvariant region of CF patients are shown in the Table 2.

## DISCUSSION

Twenty six individuals with clinical diagnosis of CF were investigated in this study. Eleven *CFTR* gene regions of these CF patients (exons 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 20, and 21) were scanned by high-resolution melting and one region (exon 9 and intron-exon junctions) was screened directly by DNA sequencing. These regions were chosen to concentrate high mutation density according to CFMD. If considering *CFTR* nucleotide sequence, we covered almost 40% of *CFTR* coding region.

Eleven different sequence variants were identified in this CF patients group. By HRM analysis, ten different sequence variations were identified in regions of the exons 3, 7, 10, 11, 12 and 21, including six variants (R75Q, R334W, 1717-1G>A, 1812-1G>A, A561E e G576A) that were searched for by the common mutation specific protocol previously employed in our laboratory (14). Therefore, HRM method was efficient to detect new sequence variants as well as to confirm variants present in positive control samples. These results are in agreement to previous reports (13, 15), to which the HRM analysis sensibility for heterozygote detection was demonstrated to be close to 100%.

Furthermore, a novel sequence variant, named L453X, was identified by direct DNA sequencing of exon 9. This mutation creates a stop codon leading to the deletion of 1,028 C-terminus amino acids of the *CFTR* protein. Thus, the L453X can be considered as a severe allele responsible for CF phenotype.

We characterized the polyvariant (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub> region at intron 8 of *CFTR* of patients using direct DNA sequencing. We avoid HRM analysis in this case due to the feature of this region. Alleles (TG)<sub>10</sub>T<sub>7</sub>, (TG)<sub>11</sub>T<sub>7</sub>, (TG)<sub>12</sub>T<sub>7</sub>, and (TG)<sub>10</sub>T<sub>9</sub> were determined in patients' samples. Transcripts derived from genes that carry seven or nine thymidines (7T

and 9T, respectively) show lower levels of exon 9 skipping (6). Therefore, phenotype of CF patients was not affected by  $(TG)_mT_n$  genotype.

Scanning *CFTR* gene using HRM analysis and DNA sequencing enabled the characterization of 30 out of 52 mutant alleles in our sample that represents 57.7% of CF alleles. As a whole, the genotype was completely established in 7/26 (26.9%) patients, one CF allele was detected in 16/26 (61.6%) individuals, and no mutant allele was found in 3/26 (11.5%) patients. These rates are adequate when considering that we searched less than 50% of *CFTR* coding regions. We are currently extending this approach to cover the remaining coding regions of the gene.

Molecular diagnosis is essential to confirm a CF diagnosis mainly in atypical cases of CF and early diagnosis is critical for a more successful therapy. Besides, molecular analysis is key information in the genetic counseling process to offer carrier detection or additional prevention measures. Thus, methodologies that provide a rapid and efficient molecular diagnosis are useful to establish a diagnosis at an early age even before disease onset. The inclusion of alternative methodologies can change mean age of patients at diagnosis, contributing for lowering this age. This is of particular relevance to cases in Brazil where the mean age at diagnosis was reported to be 4.2 years (16).

In summary, this study demonstrated that HRM can be successfully employed in the identification of mutant alleles associated to CF. Methodology was capable of identifying different sequence variations, being able to detect known mutations as well as find novel sequence variations. Thus, HRM is a method to be potentially adapted to different applications in molecular diagnosis of CF and also of other monogenic disorders.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to patients and their families for providing biological material for this study. We would also like to thank physicians from Pneumology Service for patients' clinical evaluation. This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq, FAPERGS and FIPE-HCPA).

## REFERENCES

- (1) Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR: Cystic Fibrosis. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York, McGraw-Hill, 2001, pp. 5121-5180
- (2) 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 LC: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989, 245:1066-1073
- (3) 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, 245:1059-1065
- (4) 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, 245:1073-1080
- (5) Gadsby DC, Vergani P, Csanády L: The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature Rev* 2006, 440:477-483
- (6) Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A, Cutting GR: Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet* 2002, 71:294-303
- (7) Faucz FR, Souza DAS, Olandoski M, Raskin S: CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet* 2010, 55:71-76

- (8) Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML: CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab* 2003, 78: 259-264
- (9) Araújo FG, Novaes FC, Santos NPC, Martins VC, Souza SM, Santos SEB, Ribeiros-Santos AKC: Prevalence of DF508, G551D, G542X and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005, 38(1):11-15
- (10) Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ: High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin Chem* 2003, 49(6):853-860
- (11) Reed GH, Kent JO, Wittwer CT: High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 2007, 8(6):597-608
- (12) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988 16(3):1215
- (13) Audrezet M-P, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C: Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn* 2008, 10(5):424-434
- (14) Friedrich D: Análise molecular de mutações frequentes em pacientes com suspeita clínica de Fibrose Cística. PhD Thesis 2010, 58pp
- (15) Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, Zhou L: Scanning the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Using High-Resolution DNA Melting Analysis. *Clin Chem* 2007, 53(11):1891-1898
- (16) Alvarez AE, Ribeiro AF, Hesselm G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD: Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J Pediatr* 2004, 80:371-379

**Table 1. Sequence variations detected by HRM analysis of the *CFTR* gene.**

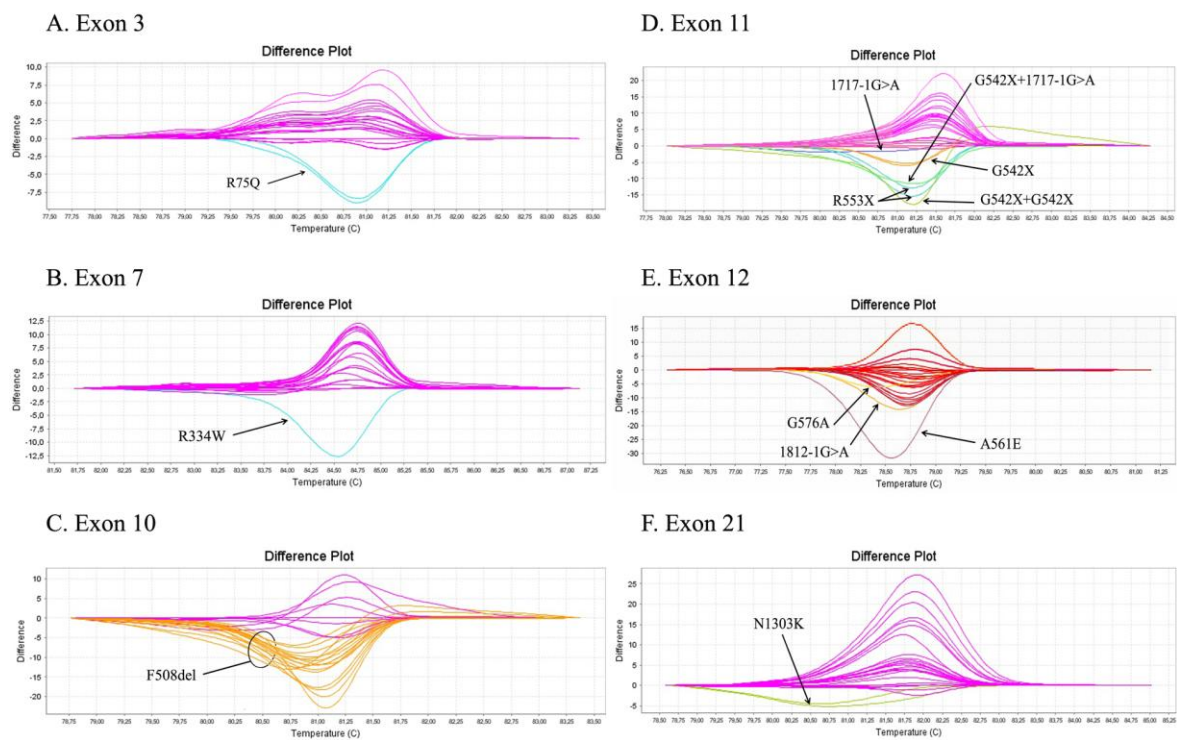
Confirmation of mutations was performed by direct DNA sequencing analysis.

<b>Exon</b>	<b>Number of variant alleles</b>	<b>Sequence variants identified</b>
<b>3</b>	2	R75Q
<b>4</b>	-	
<b>5</b>	-	
<b>7</b>	1	R334W
<b>8</b>	-	
<b>10</b>	16	F508del
<b>11</b>	2	1717-1G>A
	2	G542X
	2	R553X
<b>12</b>	1	1812-1G>A
	1	A561E
	1	G576A
<b>18</b>	-	
<b>20</b>	-	
<b>21</b>	1	N1303K
<b>Total</b>	29	

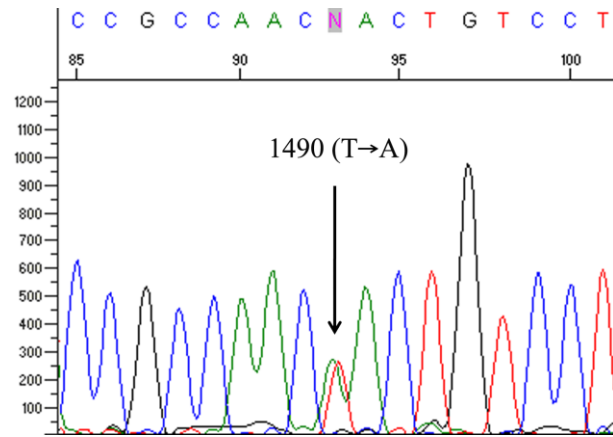
**Table 2. *CFTR* genotype and polymorphic (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> region characterization of 26 CF patients.**

<b>Genotype</b>	<b>(TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub></b>	<b>Number of patients</b>
F508del/R334W	(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
F508del/1717-1G>A	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub>	1
F508del/1812-1G>A	(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
F508del/?	(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	7
F508del/?	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub>	5
F508del/?	(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub>	1
G542X/1717-1G>A	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub>	1
G542X/?	(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
R553X/R75Q	(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
R553X/G576A	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>12</sub> T <sub>7</sub>	1
N1303K/?	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>9</sub>	1
L453X/A561E	(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
R75Q/?	(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
??	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
??	(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>11</sub> T <sub>7</sub>	1
??	(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub> /(TG) <sub>10</sub> T <sub>7</sub>	1
<b>Total</b>		<b>26</b>

? denotes unidentified mutation.



**Figure 1. Difference plots of *CFTR* gene coding regions.** Abnormal melting profiles reveal in (A) the presence of the R75Q variant in exon 3; (B) R334W mutation in exon 7; (C) F508del mutation in exon 10; (D) 1717-1G>A, G542X, and R553X mutations in exon 11; (E) 1812-1G>A, A561E, and G576A mutations in exon 12; and (F) N1303K mutation in exon 21. Positive controls: a heterozygous for F508del (exon 10); a homozygous for G542X, a heterozygous for G542X, a heterozygous for R553X (exon 11); and a heterozygous for N1303K (exon 21).



**Figure 2. Direct DNA sequencing of exon 9 from a CF patient.** Direct sequencing of part of *CFTR* exon 9 from the reverse primer. The arrow indicates the position of a T to A substitution at nucleotide 1490 that causes the nonsense mutation L453X. The sequence variation was confirmed by sequencing from the forward primer.

#### 4. DISCUSSÃO

A população brasileira é altamente heterogênea, devido principalmente às diferentes ondas migratórias que ocorreram na história do país e ao grande número de diferentes subpopulações existentes. Os estados do sul do Brasil apresentam uma grande contribuição de imigrantes europeus, provenientes principalmente de Portugal, da Itália, da Espanha e da Alemanha, causando uma maior diversidade étnica nessa região (Salzano e Freire-Maia, 1967). Essa diversidade da população brasileira se reflete na grande heterogeneidade alélica do locus *CFTR* e na variação das frequências das mutações e polimorfismos presentes neste gene. Um exemplo é a mutação F508del, cuja frequência varia de 22,7 a 50,0% entre os estados do Brasil (Faucz *et al.*, 2010).

Visto que a maioria das mutações no gene *CFTR* é rara e que muitas foram identificadas em apenas determinados indivíduos ou famílias, é evidente a necessidade de metodologias que possibilitem uma análise mais abrangente do gene. A análise de dissociação em alta resolução (HRM) se mostrou um método de varredura com vantagens sobre outras técnicas existentes (SSCP, por exemplo), como rapidez de execução e facilidade na obtenção dos resultados após a padronização da metodologia, devido à possibilidade de automação e à ausência de processamento das amostras durante as etapas da análise.

Nesse estudo, o método HRM foi sensível para identificar corretamente todos os controles positivos (amostras apresentando mutações identificadas previamente por outra metodologia) e discriminá-los dos controles negativos (amostras sem alteração na sequência de DNA). Através da análise por HRM, as mutações R75Q, R334W, F508del, 1717-1G>A, G542X, R553X, 1812-1G>A, A561E, G576A e N1303K foram identificadas. Além disso, uma amostra heterozigota composta para duas alterações (1717-1G>A/G542X) na região do éxon 11 apresentou perfil de dissociação diferente das amostras portadoras de apenas uma destas alterações, demonstrando a sensibilidade da análise. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente (Montgomery *et al.*, 2007; Audrezet *et al.*, 2008), em que o método HRM apresentou sensibilidade de detecção de heterozigotos próxima a 100%.



Neste trabalho, nós analisamos a região polimórfica  $(TG)_nT_m$  presente no íntron 8 do gene *CFTR* através do sequenciamento do éxon 9 e suas regiões adjacentes. A análise por HRM não foi realizada neste caso pela possibilidade de geração de resultados confusos devido a presença da região polimórfica. Os pacientes analisados apresentaram os alelos  $(TG)_{10}T_7$ ,  $(TG)_{11}T_7$ ,  $(TG)_{12}T_7$  e  $(TG)_{10}T_9$ . Conforme descrito anteriormente, os transcritos derivados de alelos com 7 ou 9T apresentam baixos níveis de remoção do éxon 9 (Hefferon *et al.*, 2002). Portanto, os pacientes incluídos neste estudo provavelmente não apresentam fenótipo de FC influenciado pelo polimorfismo  $(TG)_nT_m$ .

O sequenciamento do éxon 9 também permitiu a identificação de uma amostra heterozigota para a variante L453X, a qual ainda não está descrita na literatura. Essa alteração promove a substituição de uma leucina por um códon de terminação no resíduo 453 da proteína, levando à perda de 1.028 aminoácidos na porção carboxi-terminal da proteína CFTR. Alterações na sequência nucleotídica que levam à criação de códon de terminação prematuro geralmente afetam drasticamente a função da proteína resultante. Um alelo contendo a alteração L453X provavelmente produz uma proteína não-funcional, visto que a maior parte da sequência de aminoácidos não é sintetizada. Portanto, L453X deve estar relacionada a um fenótipo mais grave de FC.

Neste estudo, 26 pacientes com FC provenientes da região sul do Brasil foram analisados e um total de 11 variações de sequência diferentes foram identificadas através da análise por HRM e de sequenciamento direto do DNA. Adotando esta estratégia, o número de alelos caracterizados nos pacientes aumentou de 21 (40,4%) para 30 (57,7%).

O genótipo de 7 (26,9%) pacientes foi completamente determinado. Em 16 (61,6%) pacientes apenas uma alteração foi detectada e em 3 (11,5%) pacientes não foi encontrada nenhuma alteração no gene *CFTR*. A definição de todos os genótipos só seria esperada se fosse analisada, pelo menos, toda a região codificante do gene *CFTR*. A estratégia descrita nesse estudo abrangeu aproximadamente 40% da região codificante do gene *CFTR*. A escolha dessas regiões se baseou na maior densidade de mutações nessas regiões quando comparadas a outras regiões desse gene.

Portanto, esse estudo demonstrou que análise por HRM pode ser empregada com sucesso na identificação de alelos mutantes associados à FC. A metodologia foi capaz de identificar diferentes variações de sequência, tendo a capacidade de detectar mutações conhecidas e encontrar variações de sequência novas. Então, análise por HRM é um

método a ser adaptados para diferentes aplicações no diagnóstico molecular de FC e também de outras doenças monogênicas.

## 5. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas através deste estudo foram:

- ✓ O método HRM, seguido por sequenciamento direto de DNA, se mostrou adequado para detectar alterações na sequência nucleotídica do gene *CFTR*, identificando uma grande quantidade de variantes;
- ✓ As mutações R75Q, R334W, F508del, 1717-1G>A, G542X, R553X, 1812-1G>A, A561E, G576A e N1303K foram identificadas por HRM no grupo de pacientes analisados;
- ✓ A mutação L453X, ainda não descrita na literatura, foi identificada em um paciente com FC, por sequenciamento direto do éxon 9;
- ✓ A região polivariante (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> foi caracterizada nos 26 pacientes com FC e nenhum deles apresentou o alelo com 5T;
- ✓ Esse estudo permitiu a identificação da alteração de 30 dos 52 alelos mutantes (57,7%);
- ✓ O genótipo de 7 (27,0%) pacientes foi definido e alteração em um dos alelos mutantes foi identificada em 16 (61,5%) pacientes.

## 6. REFERÊNCIAS

- Accurso FJ and Sontag MK (2008) Gene modifiers in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 118:839–841.
- Akabas MH (2000) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275(6):3729-3732.
- Audrezet M-P, Dabricot A, Le Marechal C and Ferec C (2008) Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn* 10(5):424-434.
- Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, Algire M, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A *et al* (2006) Relative Contribution of Genetic and Nongenetic Modifiers to Intestinal Obstruction in Cystic Fibrosis. *Gastroenterology* 131:1030-1039.
- Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP and Farrell PM (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Hum Mut* 19:575-606.
- Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J and Sinaasappel M (2006) Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61:627-635.
- Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombier C, Brown A *et al* (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7(3):179-196.
- 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.
- Collaco JM and Cutting GR (2008) Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 14(6): 559–566.
- Cutting GR (2005) Modifier Genetics: Cystic Fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:237-260.
- Dalcin PTR and Abreu e Silva FA (2008) Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *J Bras Pneumol* 34(2):107-117.
- Davies J, Alton E and Griesenbach U (2005) Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med* 98(Suppl. 45):47–54.
- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, Georges M, Ferec C, Macek M *et al* (2009) Best practice guidelines for molecular

genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17:51-65.

- Durno C, Corey M, Zielenski J, Tullis E, Tsui L-C and Durie P (2002) Genotype and Phenotype Correlations in Patients With Cystic Fibrosis and Pancreatitis. *Gastroenterology* 123:1857-1864.
- Faucz FR, Souza DAS, Olandoski M and Raskin S (2010) CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet* 55:71-76.
- Gadsby DC, Vergani P and Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature Rev* 440:477-483.
- 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.
- Graham R, Liew M, Meadows C, Lyon E and Wittwer CT (2005) Distinguishing Different DNA Heterozygotes by High-Resolution Melting. *Clin Chem* 51(7):1295-1298.
- Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS and Desnick RJ (2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet in Med* 3(2):149-154.
- 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.
- Guggino WB and Stanton BA (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:426-436.
- Guo Y, Su M, McNutt MA and Gu J (2009) Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain. *J Histochem Cytochem* 57(12):1113-1120.
- Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A and Cutting GR (2002) Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet* 71:294-303.
- Hodges CA, Palmert MR and Drumm ML (2008) Infertility in females with cystic fibrosis is multifactorial: evidence from mouse models. *Endocrinology* 149(6):2790-2797.
- Jarząbek K, Zbucka M, Pepiński W, Szamatowicz J, Domitrz J, Janica J, Wołczyński S, Szamatowicz M (2004) Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Biology* 4(2):119-129.
- 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.

- Lee TWR, Matthews DA and Blair GE (2005) Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J* 387:1-15.
- Li C and Naren AP (2005) Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther* 108:208-223.
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E *et al* (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J. Clin. Invest.* 117:683-692.
- Lyon E and Miller C (2003) Current challenges in cystic fibrosis screening. *Arch Pathol Lab Med* 127:1133-1139.
- McCarthy VA and Harris A (2005) The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol* 40(1):1-8.
- 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.
- Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO and Zhou L (2007) Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem* 53(11):1891-1898.
- Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poitout V, Prentki M, Rabasa-Lhoret R, Levy E (2008) Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* 30:153-177.
- 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.
- Raskin S, Pereira-Ferrari L, Caldeira Reis F, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L, Rosario-Filho NA *et al* (2008) Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros* 7:15-22.
- Reed GH, Kent JO and Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6):597-608.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L *et al* (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.

- Rosenstein BJ and Cutting GR (1998) The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. *J Pediatr* 132(4):589-595.
- Ross LF (2008) Newborn Screening for Cystic Fibrosis: A Lesson in public health disparities. *J Pediatr* 153(3):308-313.
- Rowntree RK and Harris A (2003) The Phenotypic Consequences of *CFTR* Mutations. *Ann Hum Genet* 67:471-485.
- Salzano F e Freire-Maia N (1967) Populações brasileiras: Aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- 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.
- Wallis C (2003) Atypical cystic fibrosis - diagnostic and management dilemmas. *J R Soc Med* 96(suppl 43):2-10.
- 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*. 8th edition. McGraw-Hill, New York, pp 5121-5180.

#### REFERÊNCIAS ELETRÔNICAS

- <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>: Cystic Fibrosis Mutation Database, acesso em janeiro de 2010.
- <http://www.hgmd.cf.ac.uk>: Human Gene Mutation Database Professional Release, acesso em 26 de outubro de 2009.
- <http://www.hgvs.org/mutnomen>: Human Genome Variation Society, acesso em janeiro de 2010.

## 7. ANEXO

### INSTRUÇÕES DA REVISTA *JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS* PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO

#### *The Journal of Molecular Diagnostics* Instructions to Authors

The Journal of Molecular Diagnostics, the official journal of the Association for Molecular Pathology (AMP), co-sponsored by the American Society for Investigative Pathology (ASIP), seeks to publish high-quality original papers on scientific advances in the field of molecular diagnostics, the translation and validation of molecular discoveries in medicine into the clinical diagnostic setting, and the description and application of technical advances in the field of molecular diagnostic medicine. The editors welcome for review manuscripts which contain: novel discoveries with direct application to clinical diagnostics or clinicopathologic correlations including studies in oncology, infectious diseases, inherited diseases, predisposition to disease, or the description of polymorphisms linked to disease states or normal variations; the application of diagnostic methodologies in clinical trials; or the development of new or improved molecular methods for diagnostic or monitoring of disease predisposition.

**Manuscript Categories.** In addition to Regular Articles, the Journal also publishes Reviews, Commentaries and Special Articles solicited by the Editor-in-Chief, as well as AMP meeting abstracts and other articles of interest to the membership. Authors who wish to publish a Review should send their curriculum vitae along with an outline of the proposed article for prior approval by the Editor-in-Chief. Reviews should have a maximum of 5,000 words, 75 references, and four tables or figures (at least one of which is mechanistic). The Journal features two special peer-reviewed sections in addition to full-length original research articles. Consultations in Molecular Diagnostics features short, case-directed articles that illustrate a classic principle, a difficult interpretation, or a new approach in molecular diagnostics. Submissions to this category should include a case report and discussion of how the use of molecular diagnostics led to resolution of the case. Technical Advances are intended to report breakthroughs in methodology or analytical tools applied to molecular diagnostics. Submissions to this category should include a detailed description of the methodological design and discussion of how this technique improves the practice of molecular diagnostics.

**Review Process.** The Editors perform an initial evaluation on all submissions to determine whether they believe the manuscript will achieve a sufficient priority score to warrant publication. Priority is determined by the Editors' assessment of the manuscript relative to other papers being considered. The aim is that expeditious treatment will enable authors to submit their manuscript elsewhere as soon as possible without suffering unnecessary delays. For manuscripts accepted for external review, the Editor-in-Chief assigns manuscripts to Associate Editors according to their expertise. The Associate Editor will solicit reviewers (typically, two external reviews are sought). Authors are encouraged to identify up to five potential reviewers. It is the practice of the Journal to conduct a blinded peer-review process. The peer-review process is kept completely confidential; it is considered a violation of this confidentiality for authors to identify or attempt to communicate directly with peer reviewers or Associate Editors regarding their manuscript. The reviewer comments and Associate Editor's recommendation are evaluated by the Editor-in-Chief for disposition and transmittal to the authors. Every effort is made to complete the review process within 45 days of the date received.

**Review Decisions.** Only a portion of manuscripts will be accepted for publication. A number of worthy manuscripts will be rejected based on priority. The Journal will advise authors whether the manuscript is accepted, acceptable with revisions, or rejected. A manuscript may be returned to the authors without outside review if the Editors find it inappropriate for publication in this Journal.

**Journal Scientific Integrity Policy.** The Journal has developed principles for defining scientific misconduct



as well as procedures for handling such matters. General guidelines are described below; detailed information can be viewed at <http://jmd.amjpathol.org/misc/integrity.shtml>. To report suspected misconduct relating to authors, reviewers, or Editors, send written complaint to the Editorial Office at The Journal of Molecular Diagnostics, 9650 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA 20814-3993 or [jmd@asip.org](mailto:jmd@asip.org). Issues relating to staff conduct should be directed to the AMP Executive Officer at the Association for Molecular Pathology, 9650 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA 20814-3993 or [mesobel@asip.org](mailto:mesobel@asip.org)

**Author Conduct.** Authorship is defined as 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2, and 3. When submitting a manuscript to the Journal, the corresponding author takes responsibility on behalf of all authors for the authorship, authenticity and integrity of the research being reported. Authors should take special care that manuscripts submitted to the Journal are prepared in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see <http://www.icmje.org>); in particular the ethical considerations regarding authorship, conflicts of interest, redundant publication and treatment and confidentiality of research subjects should be carefully adhered to. Additionally, the Journal takes great care to secure the confidentiality and integrity of the peer-review process; it is considered a violation of this confidentiality for authors to identify or attempt to communicate directly with peer reviewers or Associate Editors regarding their manuscript. The Editors will consider any deliberate ethical violation in either the reported research or the manuscript preparation and review to be actionable misconduct, the potential results of which may be manuscript rejection or public article retraction, reporting of conduct to the authors' governing institutions, and/or the denial to consider any future submissions to the Journal. Willful misconduct does not include incidents of honest misjudgment or inadvertent error. Detailed information regarding possible misconduct can be found in the Journal Scientific Integrity Policy at <http://jmd.amjpathol.org/misc/integrity.shtml>

**Manuscript Submission.** Manuscripts should be submitted online via the Rapid Review system (<http://www.rapidreview.com/ASIP2/CALogon.jsp>). Detailed instructions on preparing and submitting files can be found on the author submission website at the above URL. Authors having difficulty submitting files online should complete the online submission form on Rapid Review to receive the assigned manuscript number, and mail one electronic (disk) copy of the manuscript and figures. These items should be clearly marked with the assigned manuscript number and sent to: Karen L. Kaul, M.D., Ph.D., Editor-in-Chief, The Journal of Molecular Diagnostics, 9650 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA 20814-3993. The cover letter must state any conflicts of interest (both financial and personal), affirm that the manuscript has not been published previously and is not being considered concurrently by another publication, and affirm that all authors and acknowledged contributors have read and approved the manuscript. Submissions will be ineligible for review if previously published in any form (print or online) other than as an abstract. This includes any public posting of raw manuscripts or pre-reviewed material.

A non-refundable manuscript processing fee of U.S. \$50 is required with submission. This fee may be paid electronically at the time of submission. Manuscripts arising from research in developing countries may be eligible for waiver of the submission fee only if all authors are located in a qualifying country (waiver must be applied for at time of submission; for a list of eligible countries, see <http://jmd.amjpathol.org/misc/waivernations.pdf>). Otherwise, manuscript submission fees will not be waived.

**Manuscript Preparation.** Manuscripts should be prepared in the style of the Journal and in accordance with The Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see <http://www.icmje.org>). Standard abbreviations can be found in the CSE Style Manual (7th ed., 2006). All pages of the manuscript should be double-spaced and numbered (including references, tables and figure legends). Other formatting specifications (eg, font size and type, margin settings, etc.) are left to the authors' discretion, as papers accepted for publication will be reformatted according to the print specifications of the Journal. Manuscripts not prepared in accordance with the submission guidelines detailed below may be returned to the authors. Authors are encouraged to include a list of nonstandard abbreviations to aid reviewers. In addition, authors should be ready to comply with Editors' requests for copies of any similar works in preparation, copies of cited manuscripts that are submitted or in press, and/or supporting manuscript data (eg, data not shown, but summarized in the manuscript) that may aid the review process.

**Title Page.** The title page must include a concise title accurately reflecting the findings of the work; names (not initials) of all authors; department, institution and address where the research was performed; number of

text pages, tables and figures; a short running head (40 characters or less); grant numbers and sources of support; name, address, phone, fax, and email of the corresponding author; and name and address of author who should receive reprint requests. If an author changes employment after the study was performed, the new affiliation information for that author should be included as a footnote. Any affiliations (eg employment, consultancies, stock ownership, honoraria, expert testimony) with any organization or entity having a direct financial or personal interest in the subject matter or materials discussed in the article should also be clearly stated.

**Abstract.** An abstract of 220 words or less should be prepared on a separate sheet and should be intelligible to the general reader without reference to the text. The abstract should clearly summarize the background, methodology, results, and significance of the study. Abbreviations and citations should be avoided.

**Text.** The remaining sections of the text, which may include Introduction, Materials and Methods, Case Report, Results, Discussion, and Acknowledgments (in this order), need not begin on new pages. Commonly-abbreviated terms should be spelled out in their first occurrence and then may be referenced in abbreviation through the remainder of the manuscript. Consult the Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee website (<http://www.genenames.org/>) for gene names and symbols. For a complete list of other approved nomenclature organizations (eg, bacteria, viruses, mice), please contact the Editorial Office.

For Materials and Methods, authors should describe experimental and statistical methods in enough detail that other researchers can replicate results and evaluate claims. In general, inclusion of method or reagent details as supplementary material is not acceptable. The sequences of oligonucleotides, if not previously published, should be provided. Novel DNA or protein sequences should be deposited to an appropriate database (eg, Genbank, EMBL, SWISS-PROT), with the accession numbers included in the manuscript. When providing supplier information for materials sources, company name and location (city and state, or city and country) should be provided. Website references to company information are not permitted. All novel materials and the procedures to prepare them should be described in sufficient detail to allow their reproduction (eg, DNA constructs, analytical software). Materials that are approved for investigational-use only should be clearly indicated. Publication in the Journal implies that the authors agree, upon reasonable request, to share any materials or data that are integral to the results presented in the article, including whatever would be necessary for a skilled investigator to verify or replicate the claims. Authors must disclose upon submission any restrictions on the availability of materials or information, such as for patented or dual-purpose materials.

Reporting guidelines for specific study designs (eg, randomized controlled trials) can be found in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (see <http://www.icmje.org>). Authors must affirm that the research protocol was approved by the appropriate institutional review boards or ethics committees for human (including use of human cells or tissues) or animal experiments and that all human subjects provided appropriate informed consent and/or that regulations concerning the use of animals in research were adhered to. If race/ethnicity is reported, authors should state who determined race/ethnicity, how the options were defined, and why race/ethnicity was important in the study. Authors should be prepared to provide study protocol number(s) if requested.

Authors should obtain permission from all individuals named in the Acknowledgments who contributed substantially to the work reported (eg, data collection, analysis, or writing/editing assistance) but did not fulfill the authorship criteria. Likewise, authors should receive permission from all individuals named as sources for personal communication or unpublished data. Such permissions should be affirmed by the corresponding author in the cover letter.

**References** References should begin on a new page, be double-spaced and numbered in order of citation in the text, including citations in tables and figure legends. Complete author citation is required (use of "et al" is not acceptable). References should conform to the style of the Journal. Examples follow: Journals: Cecena G, Wen F, Cardiff RD, Oshima RG: Differential sensitivity of mouse epithelial tissues to the polyomavirus middle T oncogene. *Am J Pathol* 2006, 168:310-320 Books: Fishman AP: Pulmonary Hypertension and Cor Pulmonale. *Pulmonary Diseases and Disorders*. Edited by Fishman AP. New York, McGraw-Hill, 1988, pp. 999-1048 Web sites: See Data Supplements section below for proper use of web site references. Cite in text only. Use the digital object identifier when available. Include the name of the institution sponsoring the web site, URL address with direct linkage to the referenced information, and date

of access. In press: To be used only for papers accepted for publication. Cite as for journal with (in press) in place of volume and page numbers. Submitted papers/unpublished data: Cite in text only.

**Tables.** Tables should be typed double-spaced and submitted on separate pages, as part of the manuscript. Tables should be black and white text only and should not include figures or other non-typeset images.

**Figures.** Authors should give considerable care in preparing figures. Figures may consist of multiple related panels (labeled A, B, C, etc.) described under one figure legend. Each figure (with all of its related panels) should be arranged on a single page as it should appear in final publication. Figure panels submitted on separate pages will be arranged at the publisher's discretion. If figures are to be published in black and white, they should be submitted for review in black and white. Digital figure files are required, but authors may provide production-quality hardcopies for review purposes. Hardcopies should not differ from the output of digital figure files. When preparing composite figures, the front side of individual parts should be clearly and properly labeled. Figures should be sized to fit one column (8 cm) or two columns (17 cm). Maximum page length is 22.5 cm. Figures deviating from these dimensions will be sized at the publisher's discretion. Unwanted background material should be excluded, and edges should be straight. Figure legends should be submitted as part of the manuscript and should state the staining method and degree of magnification. If the exact scale is critical, scale bars should be used on the photograph and specified in the legend. No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same gel or blot, or from different gels or blots, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (eg, using dividing lines) and in the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable only if they are applied to the whole image, whether experimental or control image, and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original (Adapted with permission from the JCB). Any evidence of inappropriate manipulation may prompt the Editors to request an explanation and access to original data, which the authors must make available. Information can be found in the Journal Scientific Integrity Policy at <http://jmd.amjpathol.org/misc/integrity.shtml>.

Beginning July 1, The Journal of Molecular Diagnostics' requirement for color images, which has traditionally been CMYK, is changing to RGB (Red, Green, Blue) color mode. Images submitted in RGB will retain the vivid reds, greens, and blues of the original digital files for online publication. Authors should therefore submit all figures (for both new and revised manuscripts) in the RGB color mode. The preferred formats for digital figures are PDF, TIFF, and EPS. For detailed instruction on preparing digital art for submission or production, visit <http://cpc.cadmus.com/da/> or contact the Editorial Office ([jmd@asip.org](mailto:jmd@asip.org)).

**Digital Art.** Images submitted in RGB will retain the vivid reds, greens, and blues of the original digital files for online publication. Authors should therefore submit all figures (for both new and revised manuscripts) in the RGB color mode. The preferred formats for digital figures are PDF, TIFF, and EPS. For detailed instruction on preparing digital art for submission or production, visit <http://cpc.cadmus.com/da/> or contact the Editorial Office ([jmd@asip.org](mailto:jmd@asip.org)).

**Data Supplements and Non-Traditional Media.** Figures and tables that are critical to the evaluation and understanding of the research presented, but which cannot be accommodated via the print medium (eg, video), will be considered part of the manuscript submission and will be published on the Journal website if the manuscript is accepted. Supplemental material published on the Journal website is subject to the same copyright as applies to the printed article. Online data will remain associated with its article and is not subject to any modifications or updates after publication. Authors of accepted manuscripts will be charged \$50 per supplemental data file to be published on the Journal website (up to 1MB; files over 1MB will be charged an additional \$50 per megabyte).

Complex data sets such as microarray data and gene sequences should be deposited in a reliable public archive. Microarray repositories should comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) guidelines ([http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame\\_1.1.html](http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_1.1.html)). Examples include Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Tissue microarray data exchange specifications can be found at <http://www.biomedcentral.com/1472-6947/3/5>. Otherwise, the data may be published as supplemental data on the Journal's website (<http://jmd.amjpathol.org>). Beginning with the May 2010 issue, supplemental data

files published on the Journal website will be charged \$65 per file (up to 1MB; files over 1MB will be subject to an additional \$65 per megabyte).

Other materials that are not required to understand and evaluate the article may be stored on an institutional website and referenced as a URL within the manuscript text. In this case, the authors must assume responsibility for maintaining a live, unrestricted link to the material from the URL published within the article, in perpetuity. Failure to maintain a live, unrestricted link may result in retraction of the article by the Editors. Material that has been published previously (print or online) is not acceptable for posting as supplementary data. Instead, the appropriate reference(s) to the original publication should be made in the text and references.

The Editors will make the final determination as to whether a given data set is essential to the manuscript and whether they will require publication of the material on the Journal website. Failure to relinquish required materials for online publication can result in the reversal of a manuscript's acceptance.

**Copyright.** Authors will be charged \$750 per color figure per printed page (figures necessitating more than one printed page will incur an additional charge). A summary of color figure charges will be presented to the corresponding author of accepted manuscripts for approval prior to publication. Color figure charges will not be waived, but color figures may be published in black and white, pending editorial approval. Requests for black and white publication must be made prior to production to avoid color charges.

**Embargo Policy.** All information regarding the content of submitted or accepted manuscripts is strictly confidential. Information contained in or about accepted articles cannot appear in print, audio, video, or digital form or be released by the news media until the Journal embargo date has passed, not to exceed the publication date of the article. For detailed information on embargo release dates or for news media requests for preprint copies of specific articles, contact the Editorial Office at 301-634-7959 or [jmd@asip.org](mailto:jmd@asip.org).

**Financial Disclosure and Conflicts of Interest.** All authors must disclose any current or former affiliations (eg, employment, consultancies, stock ownership, honoraria, expert testimony) with any organization or entity having a direct financial or personal interest in the subject matter or materials discussed in the article. Authors should err on the side of full disclosure and should contact the Editorial Office if they have questions or concerns. This information should be provided at the time of submission and reiterated as part of copyright assignment. Failure to do so may result in manuscript rejection or editorial retraction of the article. Further information can be found in the Journal Scientific Integrity Policy at <http://jmd.amjpathol.org/misc/integrity.shtml>. Upon manuscript acceptance, all coauthors will be instructed to formally disclose all potential conflicts.

**Color Figures.** Authors will be charged \$750 per color figure per printed page (figures necessitating more than one printed page will incur an additional charge). A summary of color figure charges will be presented to the corresponding author of accepted manuscripts for approval prior to publication. Color figure charges will not be waived, but color figures may be published in black and white, pending editorial approval. Requests for black and white publication must be made prior to production to avoid color charges.

**Page Charges.** Authors will be charged \$65 per printed page. Corresponding authors of published manuscripts who are current, dues-paying members of ASIP at the time of submission will receive free page charges as a benefit of membership. Manuscripts arising from research in developing countries may be eligible for waiver of publication charges only if all authors are located in a qualifying country (for details, see <http://jmd.amjpathol.org/misc/waivernations.pdf>). Otherwise, page charges will not be waived, except for solicited editorials.

Beginning with articles accepted for the May 2010 issue, the following changes to Publications Charges will apply: Authors will be charged \$550 per color figure, \$50 per black & white or grayscale figure, and \$50 per composed table, per printed page (figures or tables necessitating more than one printed page will incur an additional charge). Authors will be charged \$65 per printed page. Corresponding authors of published manuscripts who are current, dues-paying members of ASIP at the time of submission will receive one free color figure as a benefit of membership; page charges will not be waived for ASIP members. Supplemental data files published on the Journal website will be charged \$65 per file (up to 1MB; files over 1MB will be subject to an additional \$65 per megabyte). A summary of publications charges will be presented to the corresponding author of accepted manuscripts for approval prior to publication.

**Open Choice.** In addition to publication charges outlined above, authors may elect to participate in the Journal's Open Choice program. Articles published under Open Choice will become immediately accessible on the Journal website upon publication, without the twelve-month subscriber-only access delay. Authors wishing to participate should contact the Editorial Office following manuscript acceptance. All copyright restrictions regarding reuse still apply. Cost to participate is \$3000, which must be received before article restriction is lifted.

**Reprints.** Reprints should be ordered when page proofs are returned; an order form is included with the proofs. Late reprint orders may result in additional fees. There is no extra charge for color reprints. Author reprints will be supplied in CMYK color mode because it is a printed medium, but electronic reprints will be supplied in RGB color mode for visualization on screen. Each author will receive one complimentary electronic (secure PDF) reprints for distribution at their discretion. Additional electronic reprints can be ordered at the time page proofs are returned, or at a later date. No hardcopy complimentary reprints are provided by the publisher.

**Proofs.** The corresponding author will be contacted by email once proofs are ready and will be directed to download electronic proofs from a secure website. Electronic page proofs will be provided in RGB, thus reflecting the online quality. Image files will be converted to CMYK for the printed journal; all images published online will be in RGB. Full instructions on completing proof corrections will be provided at that time. The author should check the proofs carefully, mark any printer's errors, and answer queries as requested. Author changes should be kept to a minimum. Proof corrections and replacement figures (if any) must be returned within 24 hours to avoid any delay in publication.

**Cover Figure.** The cover figure is selected by the Editors from illustrations appearing in the issue. Authors are encouraged to suggest a figure for consideration, or include an additional cover figure submission along with their manuscript submission. Cover figures are published at no charge; cover reprints are available (no complimentary reprints are provided by the publisher).

**Editorial Communications.** All correspondence concerning editorial matters should be addressed to the Editor-in-Chief at The Journal of Molecular Diagnostics, 9650 Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA 20814-3993, faxed to 301-634-7961, or emailed to [jmd@asip.org](mailto:jmd@asip.org). Letters to the Editor will be printed at the Editors' discretion in the Correspondence section.

**Corrections** are published upon request and after editorial review. Retractions are published upon request of authors or their institutions and may also be published by the Journal following a determination of scientific misconduct. Notes of Concern are published in response to editorial concerns relating to scientific or publishing misconduct by authors or reviewers or to alert the scientific community of an ongoing investigation.

***Revised: October 2009***