BC/29213
IB/80541

T/UNICAMP
P219c

SECRETÁRIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA AMOSTRA DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA DO ESTADO DE SÃO PAULO

ENEIDA ABREU PARIZOTTO

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Eneida Abreu Parizotto
e aprovada pela Comissão Julgadora.
25/10/96

Orientadora: Profª Drª Carmen Sílvia Bertuzzo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética.

Campinas/SP
1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE IB
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
P219c
V Ex
TOMBO BC/29213
PROC. 667/96
C [ ] D [x]
PREÇO R$ 11,00
DATA 3/12/96
N.º CPD

CM-00095028-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

P219c

Parizotto, Eneida Abreu
Caracterização molecular de uma amostra de pacientes com fibrose cística do Estado de São Paulo /Eneida Abreu Parizotto. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fibrose cística. 2. Genética humana. 3. Mutação (Biologia) I. Bertuzzo, Carmen Sílvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 25 de Outubro de 1996.

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. *Carmen Silvia Bertuzzo* (Orientadora)

Profa. Dra. *Christine Hackel*

Profa. Dra. *Ilma Paschoal*

Suplente:

Profa. Dra. *Denise Pontes Cavalcanti*

APROVADA

"A verdade não tem morada fixa; ela é uma coisa viva, mais viva, mais dinâmica, do que qualquer coisa que a mente possa conceber. Portanto, não pode haver caminho para ela."

J. Krishnamurti

Aos meus pais Sergio e Sonia,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca: Profa. Dra. *Carmen S. Bertuzzo*, Profa. Dra. *Christine Hackel*, Profa. Dra. *Denise P. Cavalcanti* e Profa. Dra. *Ilma Paschoal*.

Aos membros da pré-banca: Profa. Dra. *Christine Hackel*, Profa. Dra. *Denise P. Cavalcanti* e Prof. Dr. *Louis B. Klaczko*.

Aos membros da banca do exame de qualificação: Prof. Dr. *A. Sérgio Ramalho*, Profa. Dra. *Denise P. Cavalcanti* e Profa. Dra. *Maricilda P. Mello*.

À minha orientadora, Profa. Dra. *Carmen S. Bertuzzo*, por ter me aceito como sua orientada, e pelos "galhos que me quebrou" desde o início do Mestrado.

À Profa. Dra. *Christine Hackel*, pela atenção com que sempre me atendeu, especialmente respondendo minhas perguntas "saturantes".

Aos Profs. Drs. *A. Sérgio Ramalho*, *Bernardo Beiguelman*, *Denise P. Cavalcanti* e *Louis B. Klaczko*, pelo *estímulo* que, cada um a seu modo, deu-me durante o curso de pós-graduação.

Ao Dr. *A. Fernando Ribeiro*, pela colaboração na casuística deste trabalho. À Dra. *Pilar D. Espinoza*, pela colaboração na casuística e pela companhia agradável nos congressos de fibrose cística.

Ao pessoal da secretaria: *Carlos*, *Claudinha* e *Rosana*, pelas inúmeras vezes que me chamaram para atender telefone. À secretária da pós-graduação, *Teresinha*, pela atenção de sempre e eficiência com que resolve tudo.

Ao CNPq, a meus pais e aos compradores de produtos Natura, pelo apoio financeiro.

Ao "povo do DNA": *Ana Lúcia*, *Andréa*, *Heliane*, *Lúcio*, *Raquel*, *Rodrigo*, *Sílvia*, *Tânia*, *Tereza* e *Veruska*, pelos bons momentos no laboratório.

À *Andréa (Domênica)*, *Dani (Cabral)* e *Lu (Pugliesi)*, pelo ombro amigo nos momentos difíceis. Ao *Rena*, pelo apartamento (em 94), pelas caronas e pelas boas conversas que sempre tivemos.

À *Ivy*, *Ju*, *Luzinha* e *Marcela*, pela convivência gostosa que temos tido.

À *Cleide*, *Fabi* e *Vanessa*, pela amizade que mantemos desde os tempos do laboratório "do Wanderley".

À *Sandrinha*, pela acolhida carinhosa em seu apartamento e ao *Ed*, pela convivência divertida de todo dia.

À *Stela*, por suas correções e sugestões na redação desta dissertação e por ter me ajudado a acreditar no *recomeço*.

Ao 李文華 , pela paciência, pelo apoio constante, e pela alegria que tem trazido à minha vida.

Aos irmãos queridos, *Renata* e *Tuco*, por estarmos caminhando juntos.

Aos meus pais *Sergio* e *Sonia*, minha fiel retaguarda, pelo amor que recebi *sempre*.

ÍNDICE

ABREVIATURAS iii

RESUMO iv

SUMMARY v

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Características da FC Clássica 3

1.2. Diagnóstico 4

1.3. Tratamento 6

1.4. Gene da FC e Proteína CFTR 7

1.4.1 Correlação das Alterações no Transporte Epitelial com a Porteína CFTR 10

1.5. Mutações do Gene CFTR 11

1.5.1. Correlação Genótipo/Fenótipo 17

1.5.2. Freqüência das Mutações em Diferentes Populações 19

1.5.3. Freqüência das Mutações em Populações Brasileiras 22

2. OBJETIVO 25

3. PACIENTES E MÉTODOS 26

3.1. Métodos Utilizados na Análise das Mutações 26

3.1.1. Extração de DNA 26

3.1.2. Amplificação com *Taq* DNA Polimerase 28

3.1.3. Formação de Heteroduplexes de DNA 29

3.1.4. Digestão Enzimática 30

3.1.5. Análise das Amostras Amplificadas por Dot Blot (Hibridização com Oligonucleotídeos Alelo-Específicos) 31

3.2. Detecção das Mutações 32

3.2.1. Detecção da Mutação ΔF508 33

3.2.2. Detecção da Mutação G542X 35

3.2.3. Detecção da Mutação N1303K 35

3.2.4. Detecção da Mutação G551D 37

3.2.5. Detecção da Mutação R553X 37

4. RESULTADOS 39

4.1. Mutação ΔF508 39

4.2. Mutação G542X 39

4.3. Mutação N1303K 40

4.4. Mutação G551D 40

4.5. Mutação R553X 40

5. DISCUSSÃO 42

6. LITERATURA CITADA 48

ABREVIATURAS USADAS

ASO: *alelle-specific oligonucleotide*

BSA: soro albumina bovina

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane (conductance) regulator*

DLN: domínio de ligação a nucleotídeo

DR: domínio regulatório

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

DTT: ditiotreitol

FC: fibrose cística, fibrocístico(a)

kb: quilobases

pb: pares de bases

PCR: *polymerase chain reaction*

REGLAFQ: *Registro Latinoamericano de Fibrosis Quística*

r.p.m.: rotações por minuto

SDS: sódio-dodecil sulfato

Tris: tris-(hidroximetil)-amimometano

RESUMO

A fibrose cística (FC) é a mais comum das doenças hereditárias autossômicas recessivas na população de origem caucasóide, sendo potencialmente fatal. O gene responsável pela FC foi clonado em 1989 e, até o momento, mais de 620 mutações foram documentadas pelo Consórcio de Análise Genética da Fibrose Cística. Visando caracterizar a população de pacientes fibrocísticos (FC) do estado de São Paulo, estimamos a freqüência das mutações ΔF508, G542X, N1303K, G551D e R553X, as quais, segundo análise realizada em escala mundial, estão entre as 10 mais freqüentes. Os valores obtidos através da avaliação de 120 cromossomos FC foram: ΔF508 = 31,7%, G542X = 8,3%, N1303K = 2,5%. As mutações G551D e R553X não foram detectadas em nossa amostra. A taxa de detecção de mutações na população estudada foi de 42,5%. Concluímos que a avaliação de um número maior de mutações é necessária para o diagnóstico molecular de pacientes (inclusive o diagnóstico pré-natal) e para a detecção de portadores, devido à heterogeneidade desta população. A viabilidade do uso do teste genético é discutível. De qualquer modo, o estudo desta doença envolve a caracterização molecular de populações.

SUMMARY

Cystic fibrosis (CF) is the most common, potencially lethal, autosomal recessive genetic disease affecting the Caucasian populations. The gene responsible for CF was cloned in 1989 and, since its isolation, more than 620 sequence alterations were documented by the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. To characterize the CF patients population from the state of São Paulo (Brazil), we have estimated the frequency of mutations ΔF508, G542X, N1303K, G551D and R553X, which are some of the most frequent mutations worldwide. In a sample of 120 CF chromosomes, the frequencies we obtained were as follows: ΔF508 = 31,7%, G542X = 8,3%, N1303K = 2,5%. The mutations G551D and R553X were not detected in this sample. The mutation detection rate was 42,5% by analysis for these five mutations. We concluded that screening for more mutations will be necessary for molecular diagnosis (including the pre-natal molecular diagnosis) and to carrier detection, because of the ethnic heterogeneity of this population. The viability of genetic testing may be unrealistic. Anyway, the study of cystic fibrosis involves the molecular characterization of populations.

1. INTRODUÇÃO

Fibrose cística (FC) ou mucoviscidose é a mais comum das doenças recessivas autossômicas na população de origem caucasóide. Sua incidência é de 1:2500 em vários grupos populacionais (Welsh *et al.*, 1995), com uma freqüência estimada de portadores igual a aproximadamente 4%, valor considerado extremamente elevado em se tratando de uma anomalia genética monogênica.

Esta doença é potencialmente fatal e caracteriza-se principalmente por: obstrução crônica com infecções de repetição do trato respiratório, insuficiência pancreática exócrina e suas conseqüências nutricionais, e elevados níveis de eletrólitos no suor.

Atualmente grande atenção tem sido dispensada à doença respiratória, embora a situação tenha sido diferente em 1938, quando a FC foi inicialmente descrita por Anderson (1938). Esta autora descreveu pacientes com diarréia e esteatorréia resultantes de perda da função pancreática exócrina. Esta condição foi então denominada *fibrose cística do pâncreas*, porque a perda da função pancreática exócrina dos pacientes estava associada à fibrose cística do pâncreas. Naquela época, entendia-se que as infecções respiratórias em pacientes mais velhos eram secundárias à saúde debilitada e à má absorção, especialmente de vitamina A.

Posteriormente, Farber (1945) notou que pacientes com FC sofriam de obstrução causada por muco em uma série de órgãos. Este autor foi o introdutor do termo *mucoviscidose* para a doença, que tornou-se popular na literatura médica por vários anos e é usado no Brasil até hoje. Logo após a

descoberta de Farber, foi reconhecida a importância das infecções crônicas dos pulmões nos pacientes com FC, e o uso de antibióticos para o seu tratamento teve início ainda na década de 40. Neste período, Anderson & Hodges (1946) sugeriram o padrão autossômico recessivo de herança da doença.

Em 1953, di Sant'Agnese *et al.* pesquisaram a depleção de sal em crianças com fibrose cística durante uma onda de calor no verão; eles concluíram que a perda excessiva de sal ocorria pelo suor. Subseqüentemente, tais pesquisadores documentaram que os níveis de sódio e cloro no suor são elevados em todos os indivíduos com FC.

Nos últimos 35 anos, a descrição da síndrome fibrocística (FC) e de suas complicações vem sendo progressivamente aperfeiçoada.

Dois conjuntos de observações no início da década de 80 foram importantes para o rápido entendimento do defeito molecular ligado à FC. Primeiramente, Knowles *et al.* (1981) descreveram alterações nas propriedades elétricas do epitélio respiratório FC, associadas a anormalidades no transporte de sódio e cloro. A seguir, Quinton & Bijman (1983) demonstraram impermeabilidade ao cloro nos ductos das glândulas de suor. Estas observações determinaram um papel patogenético para o movimento de água e eletrólitos pelo epitélio FC e, pela primeira vez, ofereceram explicação plausível tanto para o déficit de água nas secreções mucosas (responsável pela obstrução de glândulas exócrinas), quanto para a disfunção de múltiplos órgãos.

Em 1989 o gene responsável pela FC foi clonado (Rommens *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989). Logo tornou-se claro que seu

produto, a proteína CFTR (ver descrição detalhada do gene da FC e da proteína CFTR no item 1.4), era de fato um canal de cloro defeituoso no epitélio FC (Bear *et al.*, 1992).

Atualmente, as pesquisas em andamento sobre o tema enfocam as relações estrutura-função dos produtos gênicos normal e alterado, a contribuição das diferentes mutações para a heterogeneidade do fenótipo FC, e as estratégias para resolver as anormalidades do epitélio FC (Welsh *et al.*, 1995).

1.1. Características da FC Clássica

A FC tem fenótipo complexo e os seus pacientes exibem uma grande variedade de sintomas respiratórios, gastrointestinais e no aparelho reprodutor, bem como elevados níveis de eletrólitos no suor (Tsui, 1995). A maioria dos pacientes apresenta os sintomas no início da vida; apenas uma pequena parte deles manifesta os sintomas tardiamente, na adolescência ou na idade adulta. O curso clínico da FC é, portanto, bastante variável, podendo ocorrer tanto o óbito nos primeiros dias de vida quanto a ausência de sintomas por 10-20 anos.

A doença pulmonar característica da FC é obstrutiva e crônica, estando associada ao espessamento das secreções mucosas. Infecções recorrentes e persistentes no trato respiratório, especialmente as causadas por *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*,

podem resultar em bronquiectasia e insuficiência respiratória, geralmente acompanhadas por *cor pulmonale* e morte (Korst *et al.*, 1995).

A disfunção pancreática, quando presente, pode ter início na fase fetal, causando esteatorréia pós-natal e atraso no desenvolvimento pôndero-estatural. A causa desta disfunção é a obstrução causada por secreções espessas e a subseqüente destruição das glândulas exócrinas do pâncreas, que resultam em deficiência pancreática enzimática e desnutrição (Korst *et al.*, 1995). A dilatação dos ductos pancreáticos leva à formação de pequenos cistos, de onde provém o nome da doença.

A mais importante das manifestações intestinais da FC é o íleo meconial, decorrente da obstrução do lúmen ilíaco por massa meconial viscosa.

A infertilidade é um sintoma comum nos pacientes, principalmente nos homens (95% dos homens FC são estéreis), sendo causada por bloqueio dos ductos deferentes e dos túbulos do epidídimo.

Outras manifestações da FC, embora menos freqüentes, são cirrose hepática e *diabetes mellitus* (Welsh *et al.*, 1995).

1.2. Diagnóstico

O diagnóstico da FC é sugerido pelos dados clínicos de doença pulmonar crônica obstrutiva, infecções pulmonares persistentes (particularmente as causadas por cepas mucóides de *Pseudomonas*), íleo meconial, insuficiência pancreática com atraso no desenvolvimento pôndero-estatural, ou por um histórico familial positivo. O diagnóstico é confirmado pela concentração de

cloro no suor acima de 60 meq/l, ou pela presença de mutações patológicas nos dois cromossomos do indivíduo em questão (Welsh *et al.*, 1995).

Verifica-se a presença de mutações patológicas através de testes para as mutações mais freqüentes já descritas. O diagnóstico molecular da doença consiste, portanto, na identificação de alelos mutantes patológicos nos dois cromossomos (nos dois genes FC) do paciente testado.

O teste do suor continua sendo o teste diagnóstico padrão para a maioria das populações, pois é muito mais acessível que o diagnóstico molecular. Além disto, este último só pode ser realizado com margem de detecção aceitável em populações caracterizadas em relação às mutações mais freqüentes (de acordo com Tsui, L.-C., *9th INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS*, 1996, mais de 620 mutações já foram descritas).

A metodologia do teste do suor consiste na coleta de suor através de iontoforese estimulada por pilocarpina, seguida da determinação química da concentração de cloro e sódio (Denning *et al.*, 1980). É importante destacar que algumas manifestações atípicas da doença resultam em valores do teste do suor dentro da faixa normal. Stewart *et al.* (1995), por exemplo, descreveram o caso de dois pacientes inicialmente com manifestações brandas da doença, teste do suor negativo (valores normais), mas com diagnóstico molecular positivo. Tais pacientes desenvolveram posteriormente bronquiectasia, doença pulmonar obstrutiva progressiva e colonização por *Pseudomonas*. Casos como estes enfatizam a necessidade de maior atenção no diagnóstico de pacientes atípicos e de testes diagnósticos alternativos.

1.3. Tratamento

Não há cura para a FC. O tratamento atual é paliativo, apenas melhorando a sintomatologia da doença. A terapia envolve administração de antibióticos, de broncodilatadores, de corticosteróides, fisioterapia torácica para drenagem bronquial, exercícios físicos, reposição enzimática, uso de vitaminas, nutrição apropriada e apoio psicossocial.

A análise de curvas de sobrevivência ao longo dos anos mostra que a sobrevida dos pacientes FC vem aumentando (Welsh *et al.*, 1995). As pesquisas têm resultado em diagnósticos mais precisos e em novas estratégias de tratamento.

A eficácia de novas abordagens terapêuticas tem sido o foco de muitos trabalhos. São promissoras no tratamento da doença a farmacoterapia que atua no trasnporte anormal de íons (Knowles *et al.*, 1995) e a terapia gênica somática, sendo esta última uma das principais linhas de pesquisa no estudo da FC.

Dados estatísticos do ano de 1991, da Fundação de Fibrose Cística dos Estados Unidos (Welsh *et al.*, 1995), mostram que 50% dos pacientes podem sobreviver até os 29 anos. Na Dinamarca, a sobrevida média dos pacientes é de 40 anos (Hoiby, N., *VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA*, 1995). No caso da América Latina, dados do ano de 1993 do *Registro Latinoamericano de Fibrosis Quística* (REGLAFQ), divulgados no *VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA*, (1995) mostram que a sobrevida média é de 12 anos.

1.4. Gene da FC e Proteína CFTR

Em 1985, através de análise de ligação baseada num grande número de marcadores polimórficos, o gene da FC foi mapeado no cromossomo 7, banda q31 (Tsui *et al.*, 1985). Na ausência de conhecimento prévio do defeito básico da doença, a localização cromossômica foi o guia para a localização do gene.

A estratégia usada para a clonagem, conhecida atualmente como clonagem posicional, foi o "estreitamento" da região de interesse com marcadores adicionais, a clonagem de segmentos de DNA desta região, a identificação de genes "candidatos" e o estudo de seu possível envolvimento na doença. Em 1989, esta abordagem resultou no isolamento de diversas seqüências de DNA que pareciam conter o gene (Rommens *et al.*, 1989). Com base nas propriedades bioquímicas previstas para o produto gênico e em análise genética, uma destas seqüências foi determinada como sendo o gene responsável pela FC (Riordan *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

O gene FC é um gene grande; ele abrange mais de 250.000 pares de bases (pb) ou 250 quilobases (kb) de DNA (figura 1.1) e contém 27 éxons (seqüências traduzidas). O RNAm correspondente tem 6,5 kb.

A proteína codificada pelo gene FC, devido ao seu aparente papel na ativação de canais secretores de cloro (Cl^-), foi chamada de regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (RTFC). Tanto o gene quanto a proteína são comumente denominados CFTR, originado do nome em inglês dado à proteína envolvida na FC, *cystic fibrosis transmembrane*

(conductance) regulator. Esta proteína contém 1480 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 170.000 dáltons.

A CFTR é membro de uma família de proteínas transportadoras, que inclui a glicoproteína P (de mamíferos) de resistência a múltiplas drogas, além de vários sistemas de transporte em bactérias Gram-negativas, leveduras e *Drosophila*. Ela contém cinco domínios (figura 1.1): dois domínios transmembrana, cada um composto por seis segmentos; um domínio R, supostamente regulatório, contendo diversas seqüências-consenso destinadas à fosforilação pelas proteínas quinase A e quinase C; e dois domínios de ligação a nucleotídeos (DLN), que interagem com ATP. A molécula CFTR estaria ancorada na dupla camada lipídica, predominantemente na membrana apical de células epiteliais secretoras, através dos dois domínios transmembrana (que são regiões hidrofóbicas da proteína). Os demais domínios estariam orientados para o citoplasma (Riordan *et al.*, 1989).

A seqüência de ativação da CFTR, de acordo com Anderson *et al.* (1991), seria a seguinte: após a ativação do canal, induzida pela fosforilação do domínio R (mediada pela proteína quinase A que, por sua vez, é ativada por AMP cíclico), a presença contínua de ATP – ligado ao DLN ou submetido a clivagem (via hidrólise) – manteria a atividade do canal (figura 1.2). Fosfatases celulares defosforilariam os canais, fechando-os. O controle da atividade do canal e, conseqüentemente, da taxa de transporte iônico transepitelial, dependeria do balanço entre quinases e fosfatases na célula (Berger *et al.*, 1993).

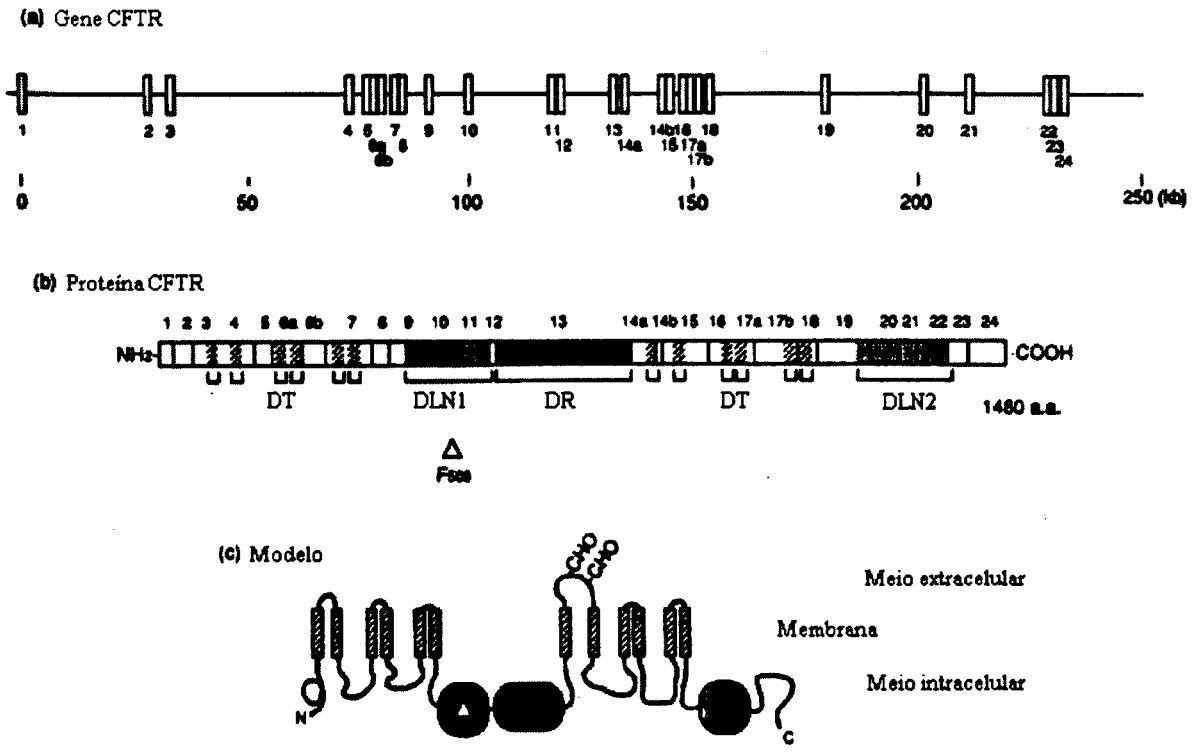

Figura 1.1. (a) O gene FC contém 27 éxons, sendo que a maior parte de sua extensão é constituída por íntrons. A nomenclatura 6a, 6b, 14a, 14b, 17a e 17b resulta da identificação destes éxons após a descrição original do gene. (b) Estrutura prevista para o produto proteico, a proteína CFTR, constituída por dois domínios transmembrana (DT), dois domínios de ligação a nucleotídeos (DLN1 e DLN2) e um domínio regulatório (DR). (c) Um modelo esquemático da estrutura prevista para a CFTR mostra a molécula ancorada na dupla camada lipídica da membrana de célula epitelial, estando os DLN e o DR orientados para o citoplasma (Tsui, 1995).

Até o momento, a proteína CFTR foi identificada na membrana apical do epitélio das vias aéreas, do epitélio intestinal, dos ductos pancreáticos e dos ductos das glândulas sudoríparas. Há dados que, indiretamente, sugerem a presença da CFTR também nas membranas de organelas, incluindo o aparato de Golgi (Barasch *et al.*, 1991).

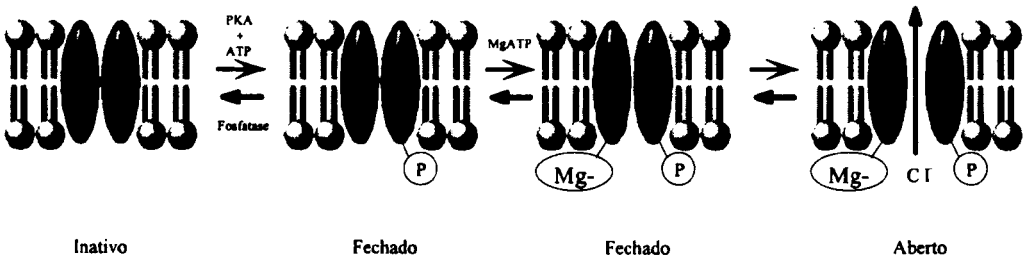

Figura 1.2. Seqüência da ativação dos canais de Cl^- CFTR. A proteína quinase A (PKA) fosforila sítios no domínio regulatório da proteína, produzindo um canal fechado, cuja abertura requer a ligação de MgATP a um ou aos dois domínios de ligação a nucleotídeos. A ligação do MgATP coloca o canal em um novo estado, podendo agora abrir espontaneamente. A reação inicial de fosforilação é reversível através de fosfatases (Frizzell, 1995).

1.4.1. Correlação das Alterações no Transporte Epitelial com a Proteína CFTR

Os epitélios secretores dos órgãos afetados são caracterizados pelo transporte eletrolítico deficiente (Quinton, 1983). A redução da permeabilidade ao cloro reduz a secreção de fluidos e eletrólitos, resultando em desidratação luminal. A hipótese da permeabilidade de Quinton (1990) pôde explicar uma variedade de manifestações da doença em diversos órgãos, como vias aéreas, pâncreas, intestinos e fígado, nos quais uma falha no *clearance* de secreções de macromoléculas levaria à obstrução, autólise e fibrose.

No nível microscópico, o defeito funcional se manifesta como inabilidade de ativação dos canais secretores de Cl^- por mecanismos dependentes de AMP cíclico (AMPc). Há evidências de que a proteína CFTR é o canal iônico defeituoso em células FC. A prova de seu envolvimento com o defeito observado no transporte eletrolítico, foi dada através da expressão de CFTR normal exógena em células epiteliais derivadas de pacientes FC (Drumm *et al.*, 1990). Esta expressão complementou ou corrigiu a condutância de Cl^- mediada por AMPc.

A CFTR funcionaria, então, como um canal que modula a secreção de Cl^- em resposta a elevações no nível de AMPc intracelular. Estudos de expressão indicam que os domínios transmembrana contribuem para o poro deste canal, e que a fosforilação de resíduos específicos no domínio R causaria sua abertura. A disfunção deste canal de Cl^- seria o principal mecanismo patofisiológico da doença.

1.5. Mutações do Gene CFTR

É importante considerar a natureza das mutações para a compreensão de como estas afetam o funcionamento da proteína CFTR. As informações sobre as mutações podem dar indícios tanto do funcionamento da proteína CFTR normal, quanto da proteína defeituosa, resultando no fenótipo FC.

A principal mutação que causa FC é uma deleção de 3 pares de bases que determina a perda de uma fenilalanina na posição 508 (ΔF508) (Kerem *et al.*,

1989). Esta mutação teve uma única origem; foi encontrada em aproximadamente 70% dos cromossomos analisados mundialmente, sendo esta porcentagem bastante variável quando as populações são avaliadas separadamente. Sua freqüência é bastante alta no norte da Europa (atinge quase 90% das mutações na Dinamarca), decrescendo no sul e leste deste continente. Em algumas populações a freqüência da mutação ΔF508 é baixa, como ocorre na população judia asquenazim, na qual ela atinge 22% do total de mutações (*The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*, 1990).

Mais de 620 mutações foram descritas além da ΔF508. Todas estas alterações foram documentadas pelo Consórcio de Análise Genética da FC (*CF Genetic Analysis Consortium*, fundado em 1989 e envolvendo, atualmente, mais de 100 grupos em todo o mundo pesquisando o gene CFTR). Surpreendentemente, grandes deleções ou rearranjos são raros, apesar do tamanho do gene (250.000 pb).

Poucas mutações registradas pelo Consórcio são deleções *in-frame*, do tipo da ΔF508. Uma outra deleção deste tipo, a ΔF507, foi encontrada na mesma região (éxon 10) do gene CFTR (Kerem *et al.*, 1990). Bem menos comum que a ΔF508, ela resulta na perda de um resíduo de isoleucina. Estas mutações ocorrem numa região onde a deleção de um único aminoácido parece resultar em alteração conformacional da proteína.

A proteína CFTR é produzida como um polipeptídeo não glicosilado que, subseqüentemente, é sujeito à glicosilação no retículo endoplasmático rugoso, translocação para o aparato de Golgi, modificação das cadeias laterais de carboidratos para sua forma madura e, finalmente, transferência

para a membrana apical (Cheng *et al.*, 1990). Experimentos *in vitro* (Cheng *et al.*, 1990) indicam que a CFTR codificada por seqüências contendo a mutação ΔF508 é anormal em termos de modificação postransducional e de transporte intracelular. Embora a proteína seja potencialmente capaz de funcionar como um canal de Cl^-, ela não consegue chegar até a membrana apical da célula e parece estar incompletamente glicosilada. É possível que outras mutações também resultem em produtos incompletamente glicosilados, o que sugere a possibilidade de que a base molecular da maioria dos casos de FC seja o transporte intracelular e o processamento da CFTR defeituosos.

Aproximadamente metade das mutações descritas são do tipo sentido trocado (*missense*) (Tsui, 1992). Elas envolvem a mudança de um único par de bases na seqüência de DNA e, conseqüentemente, a substituição de um aminoácido na proteína. Embora as mutações de sentido trocado permitam a síntese de um polipeptídeo completo, a proteína pode ser instável ou não funcional (Tsui, 1995).

Resumidamente, os efeitos dos dois tipos de mutação descritos até então podem ser divididos em três classes (Tsui, 1992). Na primeira delas, a proteína mutante permanece dentro da célula, não chegando até a membrana apical desta. É o caso da ΔF508 e, possivelmente, da maioria das mutações. Mutações da segunda classe incluem aquelas que codificam proteínas aparentemente processadas de modo correto, mas cujo canal não abre mediante estímulo de AMPc. Mutantes da terceira classe, que podem resultar de mutações de sentido trocado nos domínios transmembrana, parecem

produzir canais de Cl^- com propriedades levemente alteradas em relação ao tamanho do poro ou à duração de sua abertura.

As demais mutações patológicas resultam no que tem sido denominado de "fenótipo nulo", já que o polipeptídeo completo não é produzido. As mutações, conhecidas como sem sentido (*nonsense*), são caracterizadas pela substituição de um códon da proteína por um códon de parada, causando o término prematuro da síntese polipeptídica e, portanto, produzindo uma proteína truncada, não funcional. Mutações que alteram a matriz de leitura (*frameshift*) podem resultar também em término prematuro da síntese polipeptídica. Mutações da emenda do RNA (*splice-junction*), caracterizadas por alterações de nucleotídeos em junções éxon-íntron, devem afetar o processamento do RNAm e, tal como as mutações sem sentido e as mutações que alteram a matriz de leitura, devem resultar em ausência de proteína funcional. É interessante observar que pacientes homozigotos para estes tipos de mutações já foram detectados, sugerindo que a perda total da função da proteína CFTR não é incompatível com a vida.

Uma outra classificação tradicional para as mutações que causam FC, baseia-se em quatro mecanismos gerais de disfunção da proteína CFTR, esquematizados no diagrama da figura 1.3: mutações classe I reduzem a taxa de síntese proteica; mutações classe II afetam o processamento das proteínas; mutações classe III resultam em falhas na regulação do canal; e mutações classe IV mostram condução defeituosa através do canal.

Finalmente, substituições de nucleotídeos não-associadas à doença têm sido detectadas (Tsui, 1992). Embora alguns destes polimorfismos resultem

em alterações no aminoácido codificado, as variações aparentemente são benignas.

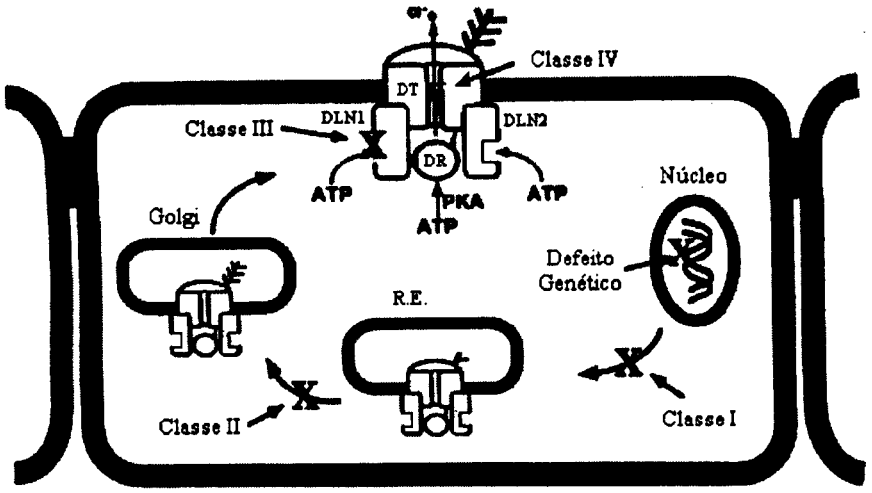

Figura 1.3. Diagrama da biossíntese e do funcionamento da CFTR em uma célula epitelial e dos mecanismos de disfunção associados com as mutações FC (Welsh *et al.*, 1995).

A análise da freqüência de mutações em relação à sua localização (figura 1.4), indica que o gene CFTR tem "pontos quentes" mutacionais (Tsui, 1992). É notória a ocorrência de um *cluster* de mutações afetando resíduos altamente conservados nos supostos DLN, especialmente no DLN1 (Cutting *et al.*, 1990). Deste fato vem a sugestão de que este DLN seja mais crítico para o funcionamento da proteína, ou de que as sequências de DNA que codificam este domínio sejam mais instáveis que outras regiões.

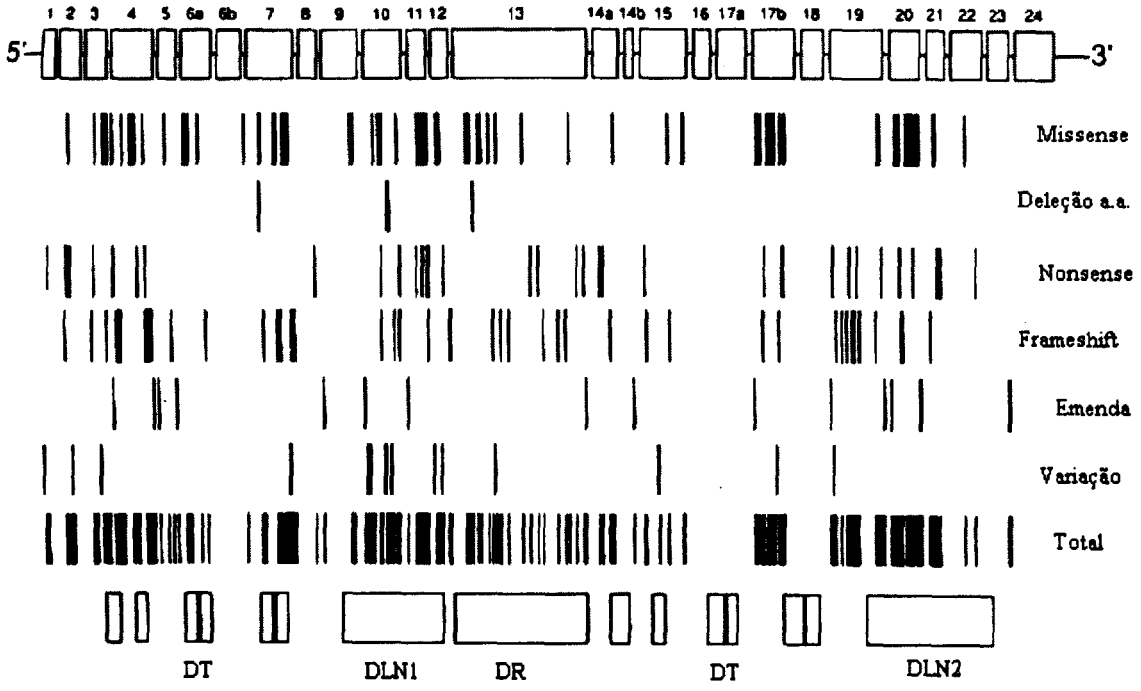

Figura 1.4. Distribuição das mutações no gene CFTR. Os éxons estão representados por boxes numerados e os domínios funcionais previstos estão denotados por boxes na parte inferior da figura. Cada barra vertical representa a localização de uma mutação documentada pelo Consórcio de Análise Genética da FC (Frizzell, 1995).

Considerando a incidência de 1:2000 em alguns grupos populacionais e o modo autossômico recessivo de herança, obtém-se como estimativa da freqüência conjunta de alelos FC para as referidas populações o valor aproximado 0,022. Diferentes mecanismos, incluindo alta taxa de mutação, vantagem do heterozigoto, deriva genética e compensação reprodutiva foram propostos para explicar a alta freqüência e, indiretamente, a natureza das mutações. Atualmente, grande atenção é dada à hipótese de ligação entre o gene CFTR e mutações benéficas que poderiam, por exemplo, conferir maior resistência a diversos tipos de diarréia.

Para Quinton (1994), a elevada freqüência de mutações FC entre caucasóides pode resultar da redução da gravidade da diarréia causada por bactérias enterotóxicas em heterozigotos para estas mutações. Ou seja, haplótipos benéficos nos quais algumas mutações FC estão presentes (principalmente o haplótipo correlacionado com a mutação ΔF508) teriam alguma vantagem seletiva e, por isso, estariam sendo selecionados através dos indivíduos heterozigotos para as mutações FC.

1.5.1. Correlação Genótipo/Fenótipo

O estudo de correlações entre mutações e expressão clínica da doença pode fornecer mais informações sobre o funcionamento da proteína CFTR, além de poder oferecer prognóstico mais preciso para pacientes, portadores e clínicos (Tsui, 1995).

A correlação genótipo/fenótipo é significativa para a função pancreática, sendo que pacientes com insuficiência pancreática (IP) têm duas mutações graves (como a ΔF508, por exemplo), e pacientes com suficiência pancreática (SP) têm uma ou duas mutações leves (Kerem *et al.*, 1989).

Por outro lado, não há correlação estabelecida entre o genótipo e o envolvimento pulmonar ou a sobrevivência para a maioria dos pacientes com fenótipo clássico. Tsui (1995) sugere que o fenótipo pulmonar seja fortemente influenciado por outros fatores genéticos ou ambientais.

Certas mutações brandas são encontradas em homens com agenesia bilateral congênita dos ductos deferentes (ABCDD) sem FC clássica. Já está bem estabelecida a alta incidência de mutações FC, em particular da mutação R117H, em pacientes saudáveis com ABCDD (Gervais *et al.*, 1993).

Zar *et al.* (1995), visando avaliar a associação entre mutações no gene CFTR e a predisposição dos pacientes FC para infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, sugerem correlação entre a aderência desta bactéria e o genótipo homozigoto para a mutação ΔF508.

Algumas mutações, como a 3849 + 10KbC→T (Highsmith *et al.*, 1994), estão associadas com concentrações normais ou quase normais de sódio e cloro no suor de pacientes com diagnóstico de FC.

Com base nas informações obtidas até então, Tsui (1992) diferencia três níveis de associação entre genótipo e fenótipo. No primeiro nível estão os sintomas ou sinais comuns a quase todos os pacientes. É o caso, por exemplo, da concentração de cloro no suor, substancialmente maior do que o normal nos pacientes FC, sugerindo que a função da proteína CFTR nos ductos das glândulas sudoríparas tem papel preponderante na determinação do fenótipo.

O segundo nível pode ser exemplificado pelo status da função pancreática. A correlação clara entre certas mutações e IP ou SP, sugere que o papel da CFTR na regulação da condução de Cl^- pode ser menos importante nos ductos pancreáticos do que nos ductos das glândulas sudoríparas. É possível que outras funções da CFTR (como a regulação de

outros canais, por exemplo) possam influenciar a gravidade dos sintomas no pâncreas.

No terceiro nível de correlação genótipo/fenótipo, exemplificado pelo status da função pulmonar, o fenótipo parece ser fortemente influenciado por outros fatores genéticos ou ambientais, ainda não definidos.

Portanto, com base nas correlações estabelecidas até então, fica difícil estabelecer um prognóstico para os pacientes FC uma vez que, conforme citado anteriormente, não existe correlação clara entre doença pulmonar (a causa primária de morte nestes pacientes) e genótipo. Entretanto, em alguns casos as informações provenientes destas correlações podem ser bastante úteis como, por exemplo, no caso de um paciente com duas mutações graves; ele deverá ser avaliado cuidadosamente para insuficiência pancreática, mesmo que inicialmente se apresente sem os achados clínicos correspondentes.

1.5.2. Freqüência das Mutações em Diferentes Populações

A aplicação mais imediata da definição do espectro de mutações em diferentes populações é o teste genético. Entretanto, com o grande número de mutações descritas, no máximo 85-90% dos alelos mutantes poderiam ser identificados através de *screening* padronizado em populações já caracterizadas em relação à distribuição de freqüências de mutações.

Poucas mutações patológicas não-ΔF508 representam mais que 1% dos cromossomos FC no mundo (tabela 1.1), embora elas possam apresentar

maiores freqüências em determinadas populações. Este é o caso, por exemplo, da mutação W1282X em 60% dos cromossomos FC da população judia asquenazim (Shoshani *et al.*, 1992), sendo que sua freqüência mundial é de 2,1%. A alta freqüência de mutações incomuns em algumas populações pode resultar de efeito fundador ou deriva genética.

Tabela 1.1. Mutações FC com freqüência relativa > 1%

Mutação	Freqüência relativa (%)
ΔF508	67,2
G542X	3,4
G551D	2,4
W1282X	2,1
3905insT	2,1
N1303K	1,8
3849 + 10KbC→T	1,4
R553X	1,3
621 + 1G→T	1,3
1717 - 1G→A	1,1
1078delT	1,1
2789 + 5G→A	1,1

Estudo em escala mundial realizado pelo Consórcio de Análise Genética da Fibrose Cística (Tsui, 1992).

Conforme já citado anteriormente, a freqüência da mutação ΔF508 é bastante alta no norte da Europa (atinge quase 90% das mutações na

Dinamarca), decrescendo no sul e leste deste continente. Nos países de onde vieram os imigrantes que mais contribuíram na formação da população paulista: Itália, Portugal e Espanha, sua freqüência é igual a 42% (Novelli *et al.*, 1990), 52% (Duarte *et al.*, 1990) e 50% das mutações FC (Chillón *et al.*, 1990), respectivamente.

Nunes *et al.* (1991) realizaram uma análise envolvendo 14 mutações em populações de cinco países do sul da Europa (incluindo Itália e Espanha). Seus resultados mostram que, nesta região, as mutações mais freqüentes depois da ΔF508 são a G542X (6,04%), R1162X (3,61%) e N1303K (3,24%). As mutações G551D e R553X, também avaliadas no citado trabalho, foram detectadas em respectivamente 0,25% e 0,1% dos cromossomos FC. A heterogeneidade molecular é grande na região avaliada, sendo que na população espanhola, a mutação mais comum depois da ΔF508 é a G542X, e na italiana, a R1162X.

Tabela 1.2. Mutações mais freqüentes* em alguns países do continente americano.

Autor	País	Mutações e respectivas freqüências
Luzardo *et al.* (1995)	Uruguai	ΔF508 (30%), G542X (5%), N1303K (5%)
Luna *et al.* (1995)	Argentina	ΔF508 (42,5%), G542X (5,0%), W1282X (1,2%); G551D e R553X não foram detectadas
Chertkoff *et al.* (1995)	Argentina	ΔF508 (57,0%), G542X (3,9%), W1282X (3,1%), N1303K (1,7%)
Collazo *et al.* (1996)	Cuba	ΔF508 (34,0%), G542X (4,0%), R1162X (0,8%)
Ng *et al.* (1991)	Países da Am. Norte	ΔF508 (75,8%), G542X (2,7%), G551D (3,2%), N1303K (1,4%), R553X (1,4%)

* Mutações mais freqüentes no grupo de mutações testadas em cada trabalho.

A tabela 1.2 mostra resultados de trabalhos de caracterização molecular de pacientes FC em diversos países do continente americano.

1.5.3. Freqüências das Mutações em Populações Brasileiras

A incidência da FC no Brasil, segundo dados do levantamento feito pelo REGLAFQ em 1994 (divulgados no *VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA, 1995)*, é menor que 1:12.000.

É importante lembrar que a população brasileira é bastante heterogênea, tendo em sua formação contribuição considerável da raça negra, na qual a incidência da FC é de 1:17.000 (di Sant'Agnese & Davies, 1976).

Mesmo assim, o valor obtido para o Brasil seria uma subestimativa, já que um problema crítico deste país é o subdiagnóstico da FC em função de uma série de fatores, dentre os quais o despreparo dos clínicos não especialistas no assunto no reconhecimento da doença, principalmente quando esta se manifesta de forma atípica (Espinoza, M.P.D. Comunicação pessoal, 1995).

A tabela 1.3 mostra o resultado de trabalhos apresentados em congressos por diversos autores, com dados referentes à freqüência da mutação ΔF508 em diversas cidades ou estados brasileiros.

No estado do Rio de Janeiro, as mutações G542X (2,8%) e G551D (1,4%) foram as duas mais freqüentes depois da ΔF508, no grupo de mutações testadas. No estado de São Paulo, as três mutações mais

freqüentes depois da ΔF508 foram a G542X (10%), N1303K (1,8%) e W1282X (1,2%).

Tabela 1.3. Freqüência da mutação ΔF508 em algumas cidades e estados brasileiros.

Autor	Cidade/Estado	Nº pacientes analisados	Freqüência ΔF508 (%)
Cabello *et al.* (1996)	Rio de Janeiro *	36	30,5
Ferri *et al.* (1995)	São Paulo *	85	33,5
Ferri *et al.* (1995)	Brasília	14	42,9
Ferri *et al.* (1995)	Recife	13	57,7
Raskin *et al.* (1996)	Paraná	32	28,0
Raskin *et al.* (1996)	Santa Catarina	17	47,0

* Estado

Em Brasília, a segunda mutação mais freqüente foi a N1303K (3,6%) e em Recife, a G542X (11,5%).

A literatura indexada apresenta alguns trabalhos de caracterização molecular de populações brasileiras. Raskin *et al.* (1993) determinaram a freqüência da mutação ΔF508 em pacientes caucasóides provenientes de cinco estados brasileiros. A freqüência obtida para o estado de São Paulo foi igual a 52%. Martins *et al.* (1993) avaliaram a freqüência da mutação ΔF508 em pacientes do estado de São Paulo. O resultado obtido foi igual a 31%, valor bem menor que o obtido por Raskin *et al.* (1993).

Buscando contribuir com a caracterização molecular de pacientes FC do estado de São Paulo, iniciamos em 1994 o presente trabalho, onde analisamos a freqüência das mutações ΔF508, G542X, N1303K, G551D e R553X.

2. OBJETIVO

A determinação das mutações mais freqüentes numa determinada população de pacientes fibrocísticos (FC) tem diversas finalidades. Uma delas, seria a delimitação do número de alelos FC analisados em diversos tipos de estudos populacionais. Até mesmo para a determinação da viabilidade da implantação do diagnóstico molecular da fibrose cística (FC) para pacientes e portadores, é preciso delimitar o número de alelos através de estudos populacionais. Portanto, o primeiro passo a ser dado neste sentido é a determinação da freqüência de alelos FC. Entretanto, conforme já visto, o locus envolvido com a FC tem um número bastante grande de alelos descritos, tornando a caracterização molecular populacional difícil, principalmente para uma população heterogênea como a brasileira.

Para contribuir com a caracterização da população de FC do estado de São Paulo, avaliamos a freqüência de cinco mutações, as quais, segundo estimativa em escala mundial, estão entre as 10 mais freqüentes. São elas: Δ F508, G542X, N1303K, G551D e R553X.

3. PACIENTES E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, foram analisados 60 pacientes provenientes do estado de São Paulo, com diagnóstico clínico e laboratorial de fibrose cística (FC) estabelecidos pelos Ambulatórios de Mucoviscidose dos Departamentos de Pediatria e Clínica Médica (disciplina de Pneumologia) do Hospital das Clínicas da UNICAMP – hospital de referência no tratamento desta doença.

Foram analisados pacientes FC dos referidos ambulatórios aos quais foi possível o acesso durante a etapa de amostragem.

O DNA destes pacientes foi extraído e, através da técnica de reação em cadeia da polimerase, regiões específicas foram amplificadas para que pudessem ser analisadas para as cinco mutações em questão: ΔF508, G542X, N1303K, G551D e R553X.

3.1. Métodos Utilizados na Análise das Mutações

3.1.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o método descrito por Woodhead *et al.* (1986), com algumas modificações.

O sangue dos pacientes foi coletado em tubos Vacutainer contendo 54 µl de EDTA 15%. Foram adicionados 5 ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH 8; KCl 10 mM; $MgCl_2$ 10 mM; EDTA 2 mM) e 125 µl de Triton 100 X a 5 ml da amostra de sangue sem o plasma. Esta mistura foi centrifugada a 2.000 r.p.m. (4°C) por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido com auxílio de pipeta Pasteur em 5 ml do tampão de lise I e a suspensão foi centrifugada nas condições acima citadas. Esta etapa foi repetida até que o *pellet* ficasse bem limpo. Ele foi, então, ressuspendido em 800 µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10 mM pH 8; KCl 10 mM; $MgCl_2$ 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM) e 25 µl de SDS 20%. Esta suspensão foi incubada a 55°C por 10 min. A seguir, foram adicionados 300 µl de NaCl 5 M e foram feitas duas extrações com 0,5 volume de fenol (previamente equilibrado com Tris-HCl pH 8) e 0,5 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A centrifugação nesta etapa foi realizada a 12.000 r.p.m. por 5 min e as extrações foram seguidas por mais duas extrações com igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi, em seguida, precipitado da fase aquosa pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Esta mistura foi centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min, e o *pellet* de DNA dissolvido em tampão constituído por Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e EDTA 1 mM.

3.1.2. Amplificação com *Taq* DNA Polimerase

As seqüências de DNA abrangendo os pontos de ocorrência das mutações analisadas foram amplificadas, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (usualmente denominada PCR, abreviatura de *polymerase chain reaction*), descrita por Saiki *et al.* (1989). Esta técnica utiliza iniciadores (oligonucleotídeos) que flanqueiam o segmento a ser amplificado; repetidos ciclos de desnaturação pelo calor, anelamento dos iniciadores a suas seqüências complementares e extensão dos iniciadores anelados com a enzima *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase promovem acúmulo exponencial do fragmento-alvo.

Os iniciadores usados na amplificação das diferentes seqüências (três seqüências de DNA foram amplificadas para a análise de cinco mutações) estão listados na tabela 3.1. Estes oligonucleotídeos foram descritos por Kerem *et al.* (1989) (C16B e C16D) e por Ng *et al.* (1991) (M11e-5, 11i-3B, 21e-05 e M21e-3).

De acordo com a técnica citada, cada reação foi realizada em ciclador de temperatura utilizando-se aproximadamente 0,5 μg de DNA genômico em 50 μl da seguinte mistura: tampão da *Taq* DNA polimerase (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,4 e 2,5 mM $MgCl_2$), 1μM de cada primer, 200 μM de cada dNTP e 1 unidade da enzima. As amostras foram cobertas com óleo mineral para impedir condensação. A seguir, foram aquecidas a 94°C por 7 min e submetidas a 30 ciclos de desnaturação (94°C por 1 min), anelamento dos iniciadores (as temperaturas usadas para as diferentes seqüências

amplificadas estão listadas na tabela 3.1; a duração desta etapa foi sempre de 1 min) e extensão (72°C por 1 min), seguidos por um período final de extensão de 7 min.

Tabela 3.1. Oligonucleotídeos (iniciadores) usados na amplificação de seqüências de DNA

Iniciador (5' → 3')	Éxon Temp. anelamento	Produto amplificado, pb
GTTTTCCTGGATTATGCCTGGGCAC (C16B)	10	98
GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC (C16D)	55°C	
CAGAGAAAGACAATATAGTTCC (M11e-5)	11	114
AAATGCTTGCTAGACCAAT (11i-3B)	56°C	
AGAAAGTATTTATTTTTTCTGGAAC (21e-5)	21	59
CCACTGTTCATAGGGATCCAG (M21e-3)	60°C	

A amplificação de cada segmento de DNA foi realizada através do uso de um par de iniciadores com orientação oposta. Os iniciadores são nomeados pelo número do éxon ou íntron de onde são provenientes, seguido por *e* para éxon ou *i* para íntron com o prefixo M no caso de serem modificados em relação à sequência original. Um 5 ou 3 no final do nome do iniciador indica seqüência *sense* ou *antisense*, respectivamente. Os iniciadores C16B e C16D não seguem esta nomenclatura.

3.1.3. Formação de Heteroduplexes de DNA

Esta técnica, descrita por Rommens *et al.* (1990) para a detecção rápida e não-radioativa da mutação ΔF508 (ver descrição desta mutação no item 3.2.1.), baseia-se na formação de heteroduplexes entre seqüências normais e mutantes (Nagamine *et al.*, 1989). Os heteroduplexes foram detectados em géis de poliacrilamida (corados com brometo de etídio) como bandas de

menor mobilidade que as constituídas por homoduplexes, possibilitando a fácil identificação de indivíduos heterozigotos. Para diferenciar os genótipos homozigotos (os homoduplexes constituídos por duas seqüências normais ou duas seqüências mutantes dificilmente são diferenciados nos géis de poliacrilamida comumente usados), seqüências amplificadas normais (seqüências-controle) foram adicionadas às amostras em teste após a reação de amplificação. Na presença de seqüências mutantes (homozigotos para a mutação ΔF508), ocorre formação de heteroduplexes após desnaturação pelo calor (5 min a 94°C) e renaturação (5 min a 65°C).

3.1.4. Digestão Enzimática

Para análise através de digestão enzimática, o DNA amplificado foi digerido de acordo com as recomendações dos fabricantes das enzimas usadas, num volume total de 20 μl.

Para a digestão com a enzima *Bst*NI, o DNA amplificado foi incubado em tampão constituído por NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM e DTT (ditiotreitol) 1 mM, suplementado com BSA (soro albumina bovina) 100 μg/ml, a 60°C.

Para a digestão com a enzima *Hin*cII, o DNA amplificado foi incubado em tampão constituído por Tris-acetato 10 mM (pH 7,5), acetato de magnésio 10 mM e acetato de potássio 50 mM, a 37°C.

Os produtos das reações de digestão enzimática foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, o qual foi submetido à eletroforese durante 1 h a 150 V e corado com brometo de etídio.

3.1.5. Análise das Amostras Amplificadas por Dot Blot (Hibridização com Oligonucleotídeos Alelo-Específicos)

Os oligonucleotídeos usados com as seqüências normais e mutantes, descritos por Ng *et al.* (1991), estão listados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Oligonucleotídeos alelo-específicos (sondas) usados

ASOs (5' → 3')	Temperatura de hibridização (°C)	Temperatura de lavagem (°C)
AGGTGGAGGTCAACGAG (G551D/R553X-N)	48	52
GAGTGGAGATCAACGAG (G551D-M)	50	54
TCTTGCTCATTTGACCTC (R553X-M)	48	52

Os ASOs (oligonucleotídeos alelo-específicos) com terminação N são relativos a seqüências normais e os com terminação M referem-se a seqüências mutantes. A temperatura de hibridização e de lavagem de cada oligonucleotídeo foi obtida a partir de sua respectiva T_m (temperatura de *melting*) que, por sua vez, foi obtida de acordo com Itakura *et al.* (1984).

Para a hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos (usualmente denominados ASOs, abreviatura de *allele-specific oligonucleotides*), foi utilizado o método descrito por Ng *et al.* (1991), com algumas modificações.

O DNA amplificado foi aplicado em membranas de nylon. A pré-hibridização foi realizada em solução de hibridização (SSC 5 X, reagente Denhardt's 5 X e SDS 0,5%), a 37°C, por pelo menos 1 h. As sondas alelo-específicas foram preparadas através de marcação da extremidade 5' com γ-^{32}P e T4 polinucleotídeo quinase. Cada sonda foi marcada separadamente e purificada em coluna de Sephadex G50. A reação foi realizada em tampão constituído por Tris-HCl 70 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10 mM e DTT 5mM, a 37°C. Foram utilizadas 15 unidades (U) da enzima para a marcação de 50 pmoles de sonda. A hibridização foi realizada em solução de hibridização, nas temperaturas listadas na tabela 3.2 (específicas para cada sonda), *overnight*. As membranas foram lavadas duas vezes durante 10 min, em solução de lavagem I (SSC 2 X e SDS 0,1%), à temperatura ambiente e, a seguir, foram lavadas durante 10 min em solução de lavagem II (SSC 5 X e SDS 0,1%), nas temperaturas listadas na tabela 3.2 (específicas para cada sonda). A exposição das membranas para a autoradiografia foi realizada *overnight*, a -70°C.

3.2. Detecção das Mutações

As mutações analisadas neste trabalho estão listadas na tabela 3.3; os métodos usados na detecção destas mutações estão na tabela 3.4.

Tabela 3.3. Mutações analisadas

Mutação	Aminoácido alterado	Nucleotídeo alterado	Éxon
ΔF508	Deleção da Phe-508	Deleção de 3 pb	10
G542X	Gly-542 → *stop*	G-1756 → T	11
N1303K	Asn-1303 → Lys	C-4041 → G	21
G551D	Gly-551 → Asp	G-1784 → A	11
R553X	Arg-553 → *stop*	C-1789 → T	11

Abreviatura dos aminoácidos: phe (F) = fenilalanina, gly (G) = glicina, asn (N) = asparagina, lys (K) = lisina, asp (D) = ácido aspártico, arg (R) = arginina. *Stop* = códon finalizador de tradução.

Tabela 3.4. Métodos usados na detecção das mutações

Mutação	Método
ΔF508	PCR éxon 10 + Formação de heteroduplexes de DNA
G542X	PCR éxon 11 + Digestão com *Bst*NI
N1303K	PCR éxon 21 + Digestão com *Bst*NI
G551D	PCR éxon 11 + Digestão com *Hin*cII + Hibridização com ASOs
R553X	PCR éxon 11 + Digestão com *Hin*cII + Hibridização com ASOs

Os segmentos amplificados são fragmentos dos éxons mencionados.

3.2.1. Detecção da Mutação ΔF508

A mutação ΔF508 consiste na deleção de uma trinca de nucleotídeos (CTT) do éxon 10, correspondendo à perda da fenilalanina 508 no primeiro DLN do gene CFTR. Foi descrita por Kerem *et al.* (1989), e pode ser

detectada através de PCR de segmento do éxon 10 seguida da técnica de formação de heteroduplexes de DNA (figura 3.1).

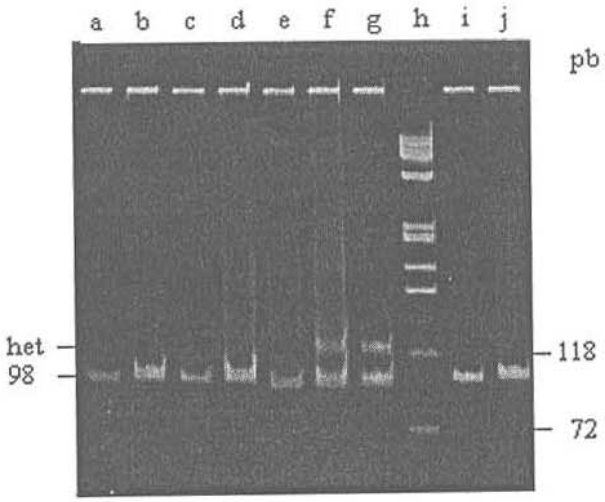

Figura 3.1. Detecção da mutação ΔF508. Análise de amplificados de segmento do éxon 10 (98 pb) em gel de poliacrilamida 8%, conforme descrito no item 3.2.1. Canaletas *a* e *b*: paciente sem a mutação; canaletas *c* e *d*: paciente sem a mutação ; canaletas *e* e *f*: paciente homozigota ; canaleta *g*: paciente heterozigota (composta); canaleta *h*: marcadores (DNA PhiX 174/*Hae* III); canaletas *i* e *j*: controle normal (sem a mutação ΔF508). Canaletas *a*, *c*, *e*, *g* e *i*: amplificados dos pacientes analisados; canaletas *b*, *d*, *f* e *j*: amplificados dos pacientes analisados misturados com igual quantidade de seqüências amplificadas normais. *het*: bandas constituídas por heteroduplexes; *pb*: pares de bases.

3.2.2. Detecção da Mutação G542X

A mutação G542X consiste em uma mutação sem sentido Gly-542 → *stop* no éxon 11 do gene CFTR, causada pela substituição G-1756 → T (Kerem *et al.*, 1990). Foi encontrada pela primeira vez em um paciente judeu asquenazim, tendo ocorrência generalizada nas populações.

Esta mutação pode ser detectada através de PCR de segmento do éxon 11 seguida de digestão enzimática com a enzima *Bst*NI. O sítio de restrição desta enzima, criado com o auxílio do primer modificado M11e-5, é suprimido pela mutação G542X. Ou seja, o fragmento de 114 pb produzido pela PCR é quebrado em fragmentos de 90 e 24 pb na ausência desta mutação, e permanece intacto em sua presença (figura 3.2).

3.2.3. Detecção da Mutação N1303K

A mutação N1303K consiste em uma mutação de sentido trocado Asn-1303 → Lys no éxon 21 do gene CFTR, causada pela substituição C-4041 → G (Osborne *et al.*, 1991). Foi descoberta em um paciente caucasóide britânico adulto, sendo a primeira mutação sem sentido descrita no segundo DLN do gene CFTR.

Pode ser detectada através de PCR de segmento do éxon 21, seguida de digestão enzimática com a enzima *Bst*NI. Como acontece no caso da mutação G542X, o sítio de restrição desta enzima, criado com o auxílio do

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

primer modificado M21e-3, é suprimido pela mutação N1303K: Na ausência desta mutação, o fragmento de 59 pb produzido pela PCR é quebrado em fragmentos de 39 e 20 pb, permanecendo intacto em sua presença (figura 3.2).

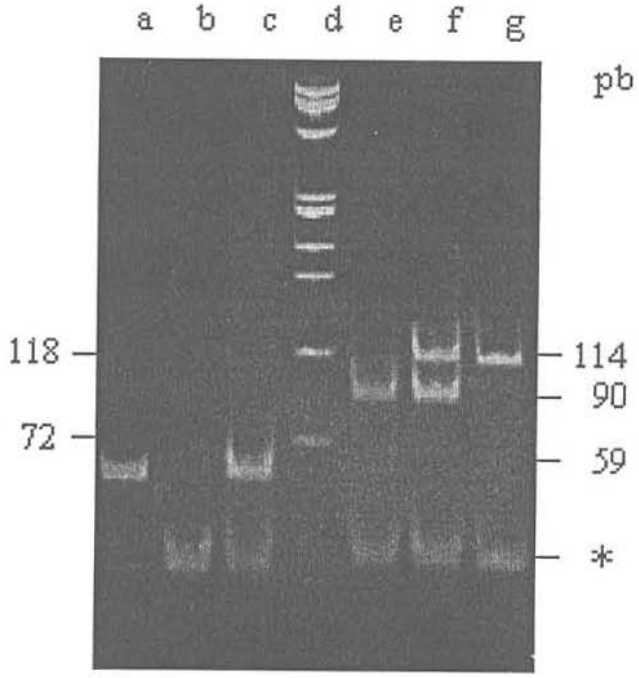

Figura 3.2. Detecção das mutações G542X e N1303K. Análise de amplificados de segmentos dos éxons 11 (114 pb) e 21 (59 pb) em gel de poliacrilamida 8%, conforme descrito nos itens 3.2.2. e 3.2.3. Canaleta *a*: amplificado de segmento do éxon 21 não digerido (controle); canaleta *b*: paciente sem a mutação N1303K; canaleta *c*: paciente heterozigoto (composto) para a mutação N1303K; canaleta *d*: marcadores (DNA PhiX 174/*Hae* III); canaleta *e*: paciente sem a mutação G542X; canaleta *f*: paciente heterozigota (composta) para a mutação G542X; canaleta *g*: amplificado de segmento do éxon 11 não digerido (controle). *pb*: pares de bases; *: fragmentos menores que 40 pb, que não se separam neste tipo de gel.

3.2.4. Detecção da Mutação G551D

A mutação G551D consiste em uma mutação de sentido trocado Gly-551 → Asp no éxon 11 do gene CFTR, causada pela substituição G-1784 → A (Cutting *et al.*, 1990).

Pode ser detectada através de PCR de segmento do éxon 11, seguida de hibridização com ASOs radioativamente marcados. Foi acrescentada uma outra etapa na detecção desta mutação, para reduzir o uso da técnica de hibridização com ASOs. Esta etapa consistiu na digestão enzimática com a enzima *Hin*cII, que quebra o fragmento amplificado de 114 pb em fragmentos de 59 e 55 pb. A presença da mutação G551D suprime o sítio de restrição desta enzima. Entretanto, a mutação R553X, também analisada no presente estudo, suprime este mesmo sítio de restrição, já que está localizada bem próxima da mutação G551D. Ou seja, a digestão com *Hin*cII serve para indicar a ausência destas mutações ou a presença de uma delas, sem especificar qual. Quando a digestão resulta em um fragmento intacto de 114 pb, a técnica de hibridização com ASOs define qual das mutações está presente.

3.2.5. Detecção da Mutação R553X

A mutação R553X consiste em uma mutação sem sentido Arg-553 → *stop* no éxon 11 do gene CFTR, causada pela substituição C-1789 → T

(Cutting *et al.*, 1990). Foi a primeira mutação sem sentido detectada no gene CFTR. Apareceu em, no mínimo, dois haplótipos em diferentes comunidades, sendo provavelmente uma mutação recorrente em um dinucleotídeo CG – um "ponto quente" mutacional.

Pode ser detectada através de PCR de segmento do éxon 11, seguida de hibridização com ASOs radioativamente marcados. Como descrito no item 3.2.4. para a mutação G551D, foi acrescentada uma outra etapa: a digestão enzimática com a enzima *Hin*cII, para reduzir o uso da técnica de hibridização com ASOs.

4. RESULTADOS

O DNA de 60 pacientes foi analisado quanto à presença das mutações Δ F508, G542X, N1303K, G551D e R553X. O resultado desta análise está descrito a seguir.

4.1. Mutação ΔF508

A mutação ΔF508 foi detectada em 32 pacientes, sendo 6 deles homozigotos e 26 heterozigotos compostos (possuem dois alelos FC diferentes).

A freqüência obtida para esta mutação nos 120 cromossomos analisados foi de aproximadamente 31,7%.

4.2. Mutação G542X

A mutação G542X foi detectada em 10 pacientes, todos eles heterozigotos compostos. Destes 10 pacientes, 8 são heterozigotos para esta mutação e para a ΔF508. Os outros 2 têm, além da mutação G542X, uma outra mutação não identificada.

A freqüência obtida para a mutação G542X em nossa amostra foi igual a 8,3%.

4.3. Mutação N1303K

A mutação N1303K foi detectada em 3 pacientes, todos eles heterozigotos compostos. Destes 3 pacientes, 2 são heterozigotos para esta mutação e para a ΔF508, e o terceiro tem no outro cromossomo 7 uma mutação diferente das cinco mutações avaliadas neste trabalho.

A freqüência desta mutação nos 120 cromossomos analisados é igual a 2,5%.

4.4. Mutação G551D

A mutação G551D não foi detectada em nenhum dos pacientes analisados em nossa amostra.

4.5. Mutação R553X

A mutação R553X, assim como a mutação G551D, não foi detectada nos pacientes analisados.

Dos 60 pacientes analisados, 16 tiveram genótipo definido através da análise destas cinco mutações, e 19 tiveram apenas um de seus alelos FC identificados. Os genótipos destes pacientes estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Genótipos dos pacientes avaliados

Genótipo	Pacientes
ΔF508/ΔF508	6
ΔF508/G542X	8
ΔF508/N1303K	2
ΔF508/X	16
G542X/X	2
N1303K/X	1
X/X	25
Total	60

X = alelo FC não identificado.

A tabela 4.2 mostra as freqüências obtidas para as mutações avaliadas em nossa amostra, proveniente da população do estado de São Paulo.

Tabela 4.2. Mutações FC e respectivas freqüências

Mutação	Freqüência (%) ± σ
ΔF508	31,7 ± 4,2
G542X	8,3 ± 2,5
N1303K	2,5 ± 1,4
G551D	—
R553X	—

Amostra proveniente da população do estado de São Paulo, constituída por 60 pacientes FC (ou 120 alelos FC).

5. DISCUSSÃO

O rápido acúmulo de dados sobre o espectro de mutações da FC deve-se, em parte, aos esforços coordenados dos membros do Consórcio de Análise Genética da Fibrose Cística. Este tipo de informação é essencial para o diagnóstico genético, para o entendimento da estrutura e função da proteína CFTR e, possivelmente, para o estabelecimento de correlações entre genótipo e fenótipo.

Este trabalho teve como objetivo contribuir com a caracterização da população de pacientes FC do estado de São Paulo em relação à freqüência de cinco mutações: ΔF508, G542X, N1303K, G551D e R553X.

A origem étnica da população paulista justifica a baixa freqüência da mutação ΔF508 encontrada em nosso estudo (31,7%), em relação à média mundial (aproximadamente 70%). Os países europeus de onde vieram os imigrantes que mais contribuíram na formação da referida população foram Itália, Portugal e Espanha. Nestes três países, conforme já citado, a frequência da mutação ΔF508 é igual a 42%, 52% e 50%, respectivamente.

A freqüência da mutação ΔF508 obtida neste trabalho não difere significativamente ($\chi^2_{(1)} = 0,003$; $P > 0,95$) da encontrada por Martins *et al.* (1993) para o estado de São Paulo (31%), mas difere ($\chi^2_{(1)} = 9,77$; $P < 0,01$) da encontrada no trabalho realizado por Raskin *et al.* (1993), para o mesmo estado (52%). Segundo Bertuzzo, C.S. (comunicação pessoal, 1996), o material avaliado por Raskin *et al.* foi enviado à Universidade de Vanderbilt

por médicos paulistas, os quais poderiam estar selecionando os casos mais graves, sabidamente correlacionados com a mutação ΔF508 (ver item 1.5.1).

O valor obtido para a freqüência da mutação ΔF508 em nosso trabalho também não difere significativamente dos valores obtidos por Cabello *et al.* (1996) para o estado do Rio de Janeiro ($\chi^2_{(1)} = 0,03$; $0,75 < P < 0,90$), por Ferri *et al.* (1995) para o estado de São Paulo ($\chi^2_{(1)} = 0,10$; $0,75 < P < 0,90$), e dos valores obtidos por Raskin *et al.* (1996) para o Paraná ($\chi^2_{(1)} = 0,26$; $0,50 < P < 0,75$) e Santa Catarina ($\chi^2_{(1)} = 2,79$; $0,05 < P < 0,10$) (ver tabela 1.3).

A segunda mutação mais comum em nossa amostra, a G542X, com freqüência igual a 8,3%, é uma mutação bastante comum em toda a Europa, particularmente na Europa meridional onde, segundo Nunes *et al.* (1991), ela também é a mutação mais comum depois da ΔF508, com freqüência relativa igual a 6,04%.

A freqüência obtida para a mutação G542X não difere significativamente do resultado obtido para a Europa Meridional ($\chi^2_{(1)} = 0,83$; $0,25 < P < 0,50$). Ela também não difere dos valores obtidos para o estado do Rio de Janeiro (Cabello *et al.*, 1996) e para o estado de São Paulo (Ferri *et al.*, 1995), respectivamente iguais a 2,8% e 10% ($\chi^2_{(1)} = 2,37$; $0,10 < P < 0,25$ e $\chi^2_{(1)} = 0,24$; $0,50 < P < 0,75$, respectivamente).

A terceira e última mutação detectada em nosso trabalho foi a N1303K, que, assim como a G542X, tem ocorrência generalizada na Europa. A freqüência desta mutação em nossa amostra é igual a 2,5%. Este resultado

não difere do obtido para a Europa Meridional (3,24%) ($\chi^2_{(1)} = 0,17$; $0,50 < P < 0,75$), nem do valor obtido por Ferri *et al.* (1995) para o estado de São Paulo (1,8%) ($\chi^2_{(1)} = 0,17$; $0,75 < P < 0,90$).

As mutações G551D e R553X não foram detectadas em nossa amostra. Ferri *et al.* (1995) também não detectaram estas mutações nos pacientes paulistas por eles estudados. Estas mutações têm maior freqüência nos países do norte da Europa e, talvez por este motivo, devam ser raras na população do estado de São Paulo, cuja população teve pequena contribuição daqueles países em sua formação.

Uma mutação que poderia ser testada nessa amostra em projetos futuros é a R1162X, a terceira mais comum no sul da Europa e com alta freqüência na população italiana.

A aplicação mais imediata da definição do espectro de mutações em diferentes populações é o teste genético.

Entretanto, com o grande número de mutações descritas, apenas 85-90% dos alelos mutantes podem ser identificados através de *screening* padronizado com número definido e pequeno de mutações em algumas populações já caracterizadas em relação aos alelos FC de maior freqüência.

Presume-se que a situação na população brasileira, de modo geral, seja mais complexa ainda, devido à sua diversidade étnica e às diferenças regionais.

Em nossa amostra, apenas 42,5% das mutações FC foram detectadas através da análise das cinco mutações acima mencionadas, as quais, segundo estimativa realizada em escala mundial, estão entre as 10 mais freqüentes.

Uma vez que 42,5% das mutações foram identificadas, o diagnóstico molecular só seria definitivo em 18% dos pacientes testados. No caso dos portadores, apenas 42,5% deles seriam identificados pelo teste genético envolvendo as mutações ΔF508, G542X, N1303K, G551D e R553X. O resultado negativo, neste ou no caso anterior, não exclui a possibilidade do status de portador ou de paciente FC. Ou seja: o teste genético tanto para o diagnóstico pré-natal (geralmente procurado por casais que já têm um filho FC) quanto para a detecção de portadores, só seria possível se envolvesse um número maior de mutações.

Mas, mesmo aumentando-se o número de mutações testadas, será difícil chegar à identificação de 95% dos alelos patológicos em nossa população, índice necessário para que este tipo de análise tenha margem de detecção aceitável (definiria o diagnóstico em 90,25% dos pacientes testados). Alguns trabalhos que analisaram um grande número de mutações visando caracterizar determinadas populações dão uma idéia da dificuldade desta tarefa. Chevalier Porst *et al.* (1994), por exemplo, testando 105 diferentes mutações, identificaram 86% dos alelos FC em 600 pacientes franceses avaliados, demonstrando com estes resultados a heterogeneidade de mutações em grandes amostras provenientes de populações não isoladas. Resultado semelhante pode ser observado no trabalho realizado por Bonizzato *et al.* (1995), com uma amostra de pacientes do nordeste da Itália.

Neste trabalho foi possível caracterizar 90,2% dos cromossomos FC avaliados, através da análise de 84 mutações.

Por outro lado, em populações mais homogêneas, como a população de judeus asquenazim, 97% dos alelos FC podem ser identificados através da análise de apenas cinco mutações (ΔF508, G542X, W1282X, N1303K e 3849 + 10KbC→T) (Abeliovich *et al.*, 1992).

É importante ressaltar, também, as falhas de alguns dos métodos comuns de diagnóstico molecular da FC. A digestão enzimática, bastante usada como método diagnóstico, tem por base a criação ou destruição de sítios de restrição pelas mutações. A destruição de um determinado sítio de restrição, obviamente não é um método que assegura a presença de uma mutação em particular, já que diversas mutações podem destruir um mesmo sítio de restrição. Mesmo a hibridização com oligonucleotídeos alelo-específicos pode dar resultados falsos; a mutação ΔI507, por exemplo, pode ser confundida com a ΔF508 em condições de baixa estringência durante a hibridização. Estes exemplos mostram que é necessário muito cuidado com qualquer metodologia para os testes de DNA.

O teste do suor continua sendo o diagnóstico padrão para a maioria das populações, já que é muito mais acessível que o diagnóstico molecular, principalmente quando levamos em conta a situação econômica desfavorável de tantos pacientes brasileiros, e o fato de que os laboratórios que realizam este tipo de análise costumam cobrar de acordo com o número de mutações testadas, sendo o material usado para a análise de cada mutação bastante caro.

No caso dos pacientes que podem pagar o teste genético, em apenas 18% dos pacientes o resultado seria definitivo através da análise das cinco mutações avaliadas no presente trabalho. A ausência destas mutações, ou a presença de apenas uma delas, não negaria a ocorrência da doença; ao contrário, deixaria o paciente ansioso quanto às mutações ainda não testadas.

Portanto, há grandes obstáculos ao uso do teste genético para a detecção de portadores e para o diagnóstico pré-natal da FC na população do estado de São Paulo (e provavelmente em toda a população brasileira). Por um lado, ela ainda precisa ser melhor caracterizada quanto à freqüência das mutações FC. Além disto, devido à sua heterogeneidade étnica, o teste genético provavelmente só terá margem de detecção aceitável nesta população se um número muito grande de mutações for testado, o que implica, por enquanto, em alto custo.

Concluindo, a caracterização molecular populacional é um item importante no estudo da FC, mas, conforme esperado para qualquer população não-isolada, depende da análise de um número muito grande de mutações. Os dados obtidos neste trabalho dão alguma contribuição na caracterização da população do estado de São Paulo.

6. LITERATURA CITADA

ABELIOVICH, D.; LAVON, I.P.; LERER, I.; COHEN, T.; SPRINGER, C.; AVITAL, A. & CUTTING, G.R. Screening for five mutations detects 97% of cystic fibrosis (CF) chromosomes and predicts a carrier frequency of 1:29 in the Jewish Ashkenazi population. *Am. J. Hum. Genet.*, **51**(5): 943-50, 1992.

ANDERSON, D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child.*, **56**: 344-402, 1938.

ANDERSON, D.H. & HODGES, R.G. Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am. J. Dis. Child.*, **72**: 62, 1946.

ANDERSON, M.P.; BERGER, H.A.; RICH, D.P.; GREGORY, R.J.; SMITH, A.E. & WELSH, M.J. Nucleotide triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, **67**: 775-84, 1991.

BARASCH, J.; KISS, B.; PRINCE, A.; SAIMAN, L.; GRUENERT, D. & AL-AWQATI, Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, **352**: 70-3, 1991.

BEAR, C.E.; LI, C.; KARTNER, N.; BRIDGES, R.J.; JENSEN, T.J.; RAMJEESINGH, M. & RIORDAN, J.R. Purification and fuctional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*, **68**: 809, 1992.

BERGER, H.A.; TRAVIS, S.M. & WELSH, M.J. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **268**: 2037-47, 1993.

BONIZZATO, A.; BISCEGLIA, L.; MARIGO, C.; NICOLIS, E.; BOMBIERI, C.; CASTELLANI, C.; BORGO, G.; ZELANTE, L.; MASTELLA, G.; CABRINI, G. *et al.* Analysis of the complete coding region of the CFTR gene in a cohort of CF patients from North-eastern Italy: identification of 90% of the mutations. *Hum. Genet.*, **95**(4): 397-402, 1995.

CABELLO, G.M.K.; LERENA, J.; DEGRAVE, W.; CABELLO, P.H.; GREGG, J.; GRODY, W.W. & FERNANDES, O. Screening for the 6 Most Common Caucasian Mutations Among Individuals Clinically Classified as Cystic Fibrosis Patients in Rio de Janeiro. In: 9th INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS. Rio de Janeiro, 1996. *Braz. J. Genet.*, **19**(2), supplement: 199, 1996.

CHENG, S.H.; GREGORY, R.J.; MARSHALL, J.; PAUL, S.; SOUZA, D.W.; WHITE, G.A.; O'RIORDAN, C.R. & SMITH, A.E. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, **63**: 827-34, 1990.

CHERTKOFF, L.; VISICH, A.; CARNIGLIA, L.; SEGAL, E.; GRENOVILLE, M.; PEREYRA, F. & BARREIRO, C. Identificacion de Mutaciones Frecuentes en el Gen CFTR en Pacientes Argentinos. In: VII

CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA, Santiago, 1995. *Anais*. Santiago, 1995. p.28.

CHEVALIER PORST, F.; BONARDOT, A.M.; GILLY, R.; CHAZALETTE, J.P.; MATHIEU, M. & BOZON, D. Mutation analysis in 600 French cystic fibrosis patients. *J. Med. Genet.*, **31**(7): 541-4, 1994.

CHILLÓN, M.; NUNES, V.; CASALS, T.; GIMÉNEZ, F.J.; FERNÁNDEZ, E.; BENíTEZ, J. & ESTIVILL, X. Distribution of the delta F508 mutation in 194 cystic fibrosis families. *Hum. Genet.*, **85**: 396, 1990.

COLLAZO, T.; BOFILL, A.M.; SUARDIAZ, B.; BERTOLI, A.; GOMEZ, M.; MAGARINO, C.; GRANDA, H. & HEREDERO, L. Analysis of G542X, R1162X and N1303K Mutations in 116 Cuban Patients with Cystic Fibrosis. In: 9th INTERNATIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS. Rio de Janeiro, 1996. *Braz. J. Genet.*, **19**(2), supplement: 115, 1996.

CUTTING, G.R.; KASCH, L.M.; ROSENSTEIN, B.J.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.-C.; ANTONARAKIS, S.E. & KAZAZIAN, H.H. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature*, **346**: 366-9, 1990.

DENNING, C.R.; HUANG, N.N.; CUSAY, L.R.; SHWACHMAN, H.; TOCCI, P.; WARWICK, W.J. & GIBSON, L.E. Cooperative study comparing three methods of performing sweat tests to diagnose cystic fibrosis. *Pediatrics*, **66**: 752, 1980.

DI SANT'AGNESE, P.A.; DARLING, R.C.; PERRERA, G.A. & SHEA, E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics,* **12**: 549, 1953.

DI SANT'AGNESE, P.A. & DAVIES, P. Research in Cystic Fibrosis. *New Engl. J. Med,* **295**(9): 481-5, 1976.

DRUMM, M.L.; POPE, H.A.; CLIFF, W.H.; ROMMENS, J.M.; MARVIN, S.A.; TSUI, L.-C.; COLLINS, F.S.; FRIZZELL, R.A. & WILSON, J.M. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell,* **62**: 1227-33, 1990.

DUARTE, A.; BARRETO, C.; MARQUES-PINTO, L.; TAVARES, M.C.; AMIL, J.; PINTO, M.; CHIEIRA, M.L.; CASTEDO, S. & LAVINHA, J. Cystic fibrosis in the Portuguese population: haplotype distribution and molecular pathology. *Hum. Genet.*, **85**(4): 404, 1990.

FARBER, S. Some organic digestive disturbance in early life. *J. Micr. State. Med. Soc.*, **44**: 587-94, 1945.

FERRI, A.; KIM, C.A.; ZATZ, M.; VANDERBORGHT, B.; ROZOV, T.; DAMACENO, N.; SAWAMURA, R.; FERNANDES, M.I.M.; MENDES, R.H.; BRITO, M.C.A. & PASSOS-BUENO, M.R. Estudo de Mutações do Gene da Fibrose Cística. In: 41º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Caxambu, 1995. *Braz. J. Genet.*, **18**(3), supplement: 561, 1995.

FRIZZELL, R.A. Functions of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: S54-8, 1995.

GERVAIS, R.; DUMUR, V.; RIGOT, J.M.; LAFITTE, J.J.; ROUSSEL, P.; CLAUSTERES, M. & DEMAILLE, J. High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in pacients with congenital abscence of the vas deferens. *New Engl. J. Med.*, **328**: 446, 1993.

HIGHSMITH, W.E.; BURCH, L.H.; ZHOU, Z.; OLSEN, J.C.; BOAT, T.E.; SPOCK, A.; GORVOY, J.D.; QUITTELL, L.; FRIEDMAN, K.J.; SILVERMAN, L.M.; BOUCHER, R.C. & KNOWLES, M.R. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *New Engl. J. Med.*, **331**(15): 974-80, 1994.

ITAKURA, K.; ROSSI, J.J. & WALLACE, R.B. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Anmu. Rev. Biochem.*, **53**: 323, 1984.

KEREM, B.; ROMMENS, J.M.; BUCHANAN, J.A.; MARKIEWICZ, D.; COX, T.K.; CHAKRAVARTI, A.; BUCHWALD, M. & TSUI, L.-C. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*, **245**: 1073-80, 1989.

KEREM, B.; ZIELENSKI, J.; MARKIEWICZ, D.; BOZON, D.; GAZIT, E.; YAHAV, J.; KENNEDY, D.; RIORDAN, J.R.; COLLINS, F.S.; ROMMENS, J.M. & TSUI, L.-C. Identification of mutations in regions

corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **87**: 8447-51, 1990.

KNOWLES, M.R.; GATZY, J. & BOUCHER, R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.*, **305**: 1489, 1981.

KNOWLES, M.R.; OLIVIER, K.; NOONE, P. & BOUCHER, R.C. Pharmacologic Modulation of Salt and Water in the Airway Epithelium in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: S65-9, 1995.

KORST, R.J.; MCELVANEY, N.G.; CHU, C.-S.; ROSENFELD, M.A.; MASTRANGELI, A.; HAY, J.; BRODY, S.L.; EISSA, N.T.; DANEL, C.; JAFFE, H.A. & CRYSTAL, R.G. Gene Therapy for the Respiratory Manifestations of Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: S75-87, 1995.

LUNA, M.C.; GRANADOS, P.A.; VARELA, V.; TARGOVNIK, H. & PIVETTA, O.H. Del Fenotipo al Genotipo en Pacientes Fibroquisticos Argentinos. In: VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA, Santiago, 1995. *Anais*. Santiago, 1995. p.25.

LUZARDO, G.; CRISPINO, B.; MIMBACAS, I.; AZNAREZ, I. & CARDOSO, H. Identificacion de Mutaciones del CFTR Presentes en Pacientes con FQ Provenientes de la Poblacion Uruguaya. In: VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE FIBROSIS QUÍSTICA, Santiago, 1995. *Anais*. Santiago, 1995. p.24.

MARTINS, C.S.; RIBEIRO, F. & COSTA, F.F. Frequency of the cystic fibrosis delta F508 mutation in a population from São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **26**(10): 1037-40, 1993.

NAGAMINE, C.M.; CHAN, K. & LAU, Y.-F.C. A PCR Artifact: Generation of Heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.*, **45**: 337-9, 1989.

NG, I.S.L.; PACE, R.; RICHARD, M.V.; KOBAYASHI, K.; KEREM, B.; TSUI, L.-C. & BEAUDET, A.L. Methods for analysis of multiple cystic fibrosis mutations. *Hum. Genet.*, **87**: 613-7, 1991.

NOVELLI, G.; GASPARINI, P.; SAVOIA, P.F.; PIGNATTI, P.F.; SANGIUOLO, F. & DALLAPICCOLA, B. Polymorphic DNA haplotypes and delta F508 deletion in 212 Italian CF families. *Hum. Genet.*, **85**(4): 420, 1990.

NUNES, V.; GASPARINI, P.; NOVELLI, G.; GAONA, A.; BONIZZATO, A.; SANGIULO, F.; BALASSOPOULOU, A. *et al.* Analysis of 14 cystic fibrosis mutations in five south European populations. *Hum. Genet.*, **87**: 737-8, 1991.

OSBORNE, L.; KNIGHT, R.; SANTIS, G. & HODSON, M. A Mutation in the Second Nucleotide Binding Fold of the Cystic Fibrosis Gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **48**: 608-12, 1991.

QUINTON, P.M. & BIJMAN, J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.*, **308**: 1185, 1983.

QUINTON, P.M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, **301**: 421-2, 1983.

QUINTON, P.M. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J.*, **4**: 2709-17, 1990.

QUINTON, P.M. Human genetics. What is good about cystic fibrosis? *Curr. Biol.*, **4**(8): 742-3, 1994.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANI, R. *et al.*. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am. J. Med. Genet.*, **46**(6): 665-9, 1993.

RASKIN, S.; PEREIRA, L.; FAUCZ, F.; RIBAS, P.D.; BARBOSA, C.; COSTA, D.; PIAZZA, A.; LUDWIG, N. & CULPI, L. DNA Analysis of Cystic Fibrosis in Brazilian Caucasoids. Different Regional Detection Rates After Screening for 32 CF Mutations. In: 42º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Caxambu, 1996. *Braz. J. Genet.*, **19**(3), supplement: 155, 1996.

RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAVSIC, N.; CHOU, J.-L.; DRUMM, M.L.; IANNUZZI, M.C.; COLLINS, F.S. & TSUI, L.-C. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, **245**: 1066-73, 1989.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M.; ROZMAHEL, R.; COLE, J.L.; KENNEDY, D.; HIDAKA, N.; ZSIGA, M.; BUCHWALD, M.; RIORDAN, J.R.; TSUI, L.-C. & COLLINS, F.S. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science*, **245**: 1059-65, 1989.

ROMMENS, J.; KEREM, B.; GREER, W.; CHANG, P.; TSUI, L.-C. & RAY, P. Rapid Nonradioactive Detection of the Major Cystic Fibrosis Mutation. *Am. J. Hum. Genet.*, **46**: 395-6, 1990.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. Primer-Directed Enzimatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, **239**: 487-91, 1989.

SHOSHANI, T.; AUGARTEN, A.; GAZIT, E.; BASHAN, N.; YAHAV, Y.; RIOLIN, Y.; TAL, A.; SERET, H.; YAAR, L.; KEREM, E. & KEREM, B. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am. J. Hum. Genet.*, **50**: 222-8, 1992.

STEWART, B.; ZABNER, J.; SHUBER, A.P.; WELSH, M.J. & MCCRAY, P.B. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: 899-903, 1995.

THE CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM. Worldwide survey of the F508 mutation: report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am. J. Hum. Genet.*, **47**: 354-9, 1990.

TSUI, L.-C.; BUCHWALD, M.; BARKER, D. *et al.* Cystic Fibrosis Locus Defined by a Genetically Linked Polymorphic DNA Marker. *Science*, **230**: 1054-57, 1985.

TSUI, L.-C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *TIG*, **8**: 392-8, 1992.

TSUI, L.-C. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**: S47-53, 1995.

WELSH, M.J.; TSUI, L.-C. & BEAUDET, A.L. Cystic Fibrosis. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. & VALLE, D. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7.ed. USA, McGraw-Hill, Inc., 1995. p.3799-876.

WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUEIREDO, H.; LANGDALE, J. & MALCOLM, A.D.B. Alternative methodology of gene diagnosis. In: DAVIES, K.E. *Human genetic diseases - a practical approach*. Oxford, IRL Press Limited, 1986. p.51-64.

ZAR, H.; SAIMAN, L.; QUITTELL, L. & PRINCE, A. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J. Pediatr.*, **126**: 230-3, 1995.