

FÁBIO RUEDA FAUCZ

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE CFTR NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA: RASTREAMENTO COMPLETO DOS 27
ÉXONS DO GENE CFTR COM IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM MARCADORES INTRA-GÊNICOS EM
EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lodércio Culpi

CURITIBA

2003

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Faucz, Fábio Rueda

Análise da variabilidade genética do gene CFTR na população brasileira: rastreamento completo dos 27 éxons do gene CFTR com identificação de mutações e suas associações com marcadores intra-gênicos em euro-brasileiros e afro-brasileiros./ Fábio Rueda Faucz. – Curitiba, 2003.

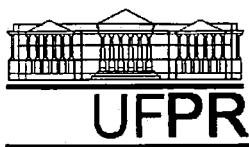
xv, 157f. : il. ; 30cm.

Orientador: Culpi, Lodércio

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas.

1. Genética 2. CFTR 3. Fibrose cística Título II. Culpi, Lodércio
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 575.1



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a que se submeteu **FÁBIO RUEDA FAUCZ**, para fins de adquirir o título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 22 de abril de 2003.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Lodércio Culpi
Orientador e Presidente

Dr. Marco Aurélio Krieger
Membro

Dr. Salmo Raskin
Membro

Prof. Dr. Rui Fernando Pilotto
Membro

Profa. Dra. Nina Amália Brância Pagnan
Membro

Visto:

Prof. Dra. Marta Margarete Cestari
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética



À minha amada esposa, Ana Karina; ao
meu filho, Eduardo (e aos que possam vir);
e aos meus avós Manoel e Azilia Irma[†].

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Prof. Dr. Lodercio Culpi, não somente pela orientação neste trabalho e por sua amizade, mas por ter, durante estes quase seis anos, a suficiente confiança em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Salmo Raskin, pela amizade, pela ajuda na obtenção das amostras, e por ter me aberto portas incríveis, que possibilitaram, não só a realização deste trabalho, mas, principalmente, o meu crescimento e aprimoramento como pessoa.

Al Dr. Xavier Estivill, el haberme aceptado a trabajar em su laboratorio (lo que me há permitido conocer de cerca un poco más del apasionante mundo de la Genética Molecular) y haber sido un tutor fantástico. Inprescindible en llevar y mejor hacer del laboratorio, ha logrado hacer especialmente llevaderas infinidad de reuniones de trabajo comentando los más mínimos detalles de la FQ, su mundo, sus mutaciones y sus personajes.

A Teresa Casals por su amistad y ayuda en el manejo de los datos sobre los pacientes FQ, por los *screenings* realizados y por el trabajo compartido para llevar a buen puerto el completo análisis de la población FQ brasileña.

A Javier Giménez, a Loli Ramos y a Miguel Chillón, por su apoyo, enseñanza y amistad (en mayúsculas) y por la ayuda prestada desinteresadamente en las numerosas horas compartidas en el laboratorio, tanto de noche como en los *cap de sem.an.*

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Petzl-Erler, por ter me apresentado a este fascinante mundo da Genética Molecular, por ter me introduzido na pesquisa de maneira tão competente e por ser a profissional fantástica que é.

Ao Christian Probst, pela amizade, pelo apoio estatístico e pelas discussões sobre genética de populações.

Às minhas amigas Daniele e Lílian, pelo apoio na confecção dos *papers*.

Ao Sérgio e Sara Sampaio que, na direção da Associação de Apoio a Mucoviscidose, permitiram o contato com as famílias.

À todas as famílias com Fibrose Cística que de forma direta ou indireta permitiram a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos.

Aos meus queridos pais Rogério e Juana, ao meu filho, Eduardo, às minhas irmãs, Tatiana e Ana Lúcia, aos meus cunhados, Diogo, Ana Helena e Sérgio, aos meus avós, Ignácio, Azilia Irma, Manoel e Santa, aos meus sogros, Erondi e Lisete, aos meus tios e primos, que me deram a estrutura familiar para poder chegar a este momento da carreira.

E muito especialmente e acima de todos á minha esposa, Ana Karina, pelo incentivo e compreensão nos inúmeros momentos em que estive ausente realizando este estudo.

*Errar é um direito de quem quer aprender;
ter humildade de recomeçar, sempre que preciso,
faz parte de ser íntegro e corajoso;
ousar é também reconhecer os próprios limites e aceitá-los.
Ninguém é obrigado a ser brilhante.
Importante é perseguir o desejo de ser feliz
e tornar-se um profissional responsável, respeitando,
antes e acima de tudo, a você mesmo e a seus princípios.*
Lucila Camargo

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 INCIDÊNCIA	3
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS.....	6
1.2.1 <i>Aparelho Respiratório</i>	8
1.2.2 <i>Aparelho Digestivo</i>	8
1.2.3 <i>Aparelho Reprodutor</i>	9
1.2.4 <i>Glândulas Sudoríparas</i>	9
1.2.5 <i>Diagnóstico e Tratamento</i>	10
1.3 ASPECTOS GENÉTICOS.....	11
1.3.1 <i>Clonagem e Identificação do Gene CFTR</i>	11
1.3.2 <i>Estrutura do Gene CFTR</i>	15
1.3.3 <i>Análise de Marcadores e Desequilíbrio de Ligação</i>	17
1.3.4 <i>Expressão do Gene CFTR</i>	22
1.3.4.1 <i>Localização da Expressão</i>	22
1.3.4.2 <i>Regulação da Expressão</i>	23
1.3.4.3 <i>Processamento de RNAm</i>	24
1.3.5 <i>Proteína CFTR</i>	25
1.3.5.1 <i>Estrutura</i>	25
1.3.5.2 <i>Funções</i>	27
1.3.5.3 <i>Regulação</i>	28
1.3.5.4 <i>Amadurecimento</i>	30
1.4 ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE CFTR.....	31

1.4.1	<i>Distribuição de Mutações na População Mundial</i>	34
1.4.2	<i>Distribuição de Mutações na População de Origem Africana</i>	35
1.4.3	<i>Distribuição de Mutações na População Brasileira</i>	36
1.4.4	<i>Correlação Genótipo-Fenótipo</i>	40
1.5	TERAPIA GÊNICA E FIBROSE CÍSTICA	45
2	MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1	FAMÍLIAS ESTUDADAS	48
2.1.1	<i>Indivíduos Normais</i>	49
2.1.1.1	Heterozigotos Euro-Brasileiros	49
2.1.1.2	Heterozigotos Afro-Brasileiros	49
2.1.2	<i>Pacientes</i>	50
2.1.2.1	Pacientes Euro-Brasileiros	50
2.1.2.2	Pacientes Afro-Brasileiros	50
2.2	EXTRAÇÃO DE DNA	51
2.3	REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)	52
2.3.1	<i>Protocolo</i>	52
2.3.2	<i>Condições</i>	53
2.3.3	<i>PCR Sítio-Dirigida</i>	55
2.3.4	<i>PCR interna ou nested-PCR</i>	56
2.4	ANÁLISE DOS MARCADORES	56
2.4.1	<i>Coloração com Nitrato de Prata</i>	59
2.5	DETECÇÃO DE MUTAÇÕES POR SSCA	59
2.5.1	<i>Preparo após a amplificação</i>	60
2.5.2	<i>Condições de Digestão e Migração</i>	60
2.6	DETECÇÃO DE MUTAÇÕES POR DGGE	62
2.7	SEQUENCIAMENTO DE PRODUTOS DE PCR	63
2.8	ELETROFORESE EM GÉIS DE AGAROSE	65
2.9	ELETROFORESE EM GÉIS DE ACRILAMIDA	66
2.9.1	<i>Protocolo geral:</i>	66
2.9.2	<i>Géis de Sequenciamento Automático</i>	67

2.9.3	<i>Géis para SSCA</i>	67
2.9.4	<i>Géis para DGGE</i>	68
2.9.5	<i>Géis para coloração com Brometo de Etídio</i>	69
2.10	ESTRATÉGIAS DA ANÁLISE MOLECULAR	70
2.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	72
2.11.1	<i>Frequência das mutações, polimorfismos e marcadores</i>	72
2.11.2	<i>Análise das frequências haplóticas</i>	72
2.11.3	<i>Desequilíbrio de Ligação</i>	73
3	OBJETIVOS	74
4	RESULTADOS	75
4.1	MARCADORES INTRA-GÊNICOS DE CFTR.....	75
4.1.1	<i>Frequência alélica dos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/Ava II, IVS17bTA, e IVS17bCA</i>	75
4.1.2	<i>Comparação Estatística das Frequências Alélicas</i>	79
4.2	HAPLÓTIPOS DE CFTR.....	86
4.3	MUTAÇÕES IDENTIFICADAS EM CFTR	88
4.3.1	<i>Frequências alélicas em indivíduos afetados</i>	88
4.3.1.1	<i>Frequências alélicas em afetados euro-brasileiros</i>	88
4.3.1.2	<i>Frequências alélicas em afetados afro-brasileiros</i>	88
4.3.2	<i>Frequências genotípicas em indivíduos afetados</i>	90
4.4	CORRELAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES EM CFTR E HAPLÓTIPOS DOS MARCADORES INTRA-GÊNICOS DE CFTR.....	92
4.4.1	<i>Frequência dos haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA</i>	92
4.4.2	<i>Frequência dos haplótipos formados pelos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/Ava II, IVS17bTA, e IVS17bCA</i>	94
4.4.3	<i>Análise de Desequilíbrio de Ligação</i>	94
4.5	IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO MEIÓTICA NO MICROSSATÉLITE IVS17bTA. ..	96
5	DISCUSSÃO	98

5.1	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DOS MARCADORES INTRA- GÊNICOS DE CFTR	99
5.1.1	<i>Marcadores IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/Ava II</i>	99
5.1.2	<i>Marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA</i>	100
5.1.3	<i>Haplótipos dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA</i>	102
5.2	IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES EM CFTR.....	104
5.2.1	<i>Mutações em Pacientes Euro-Brasileiros</i>	105
5.2.1.1	Outras Mutações em CFTR.....	106
5.2.1.2	Identificação de Duas Mutações Novas e Um Polimorfismo	109
5.2.2	<i>Mutações em Afro-Brasileiros</i>	110
5.2.2.1	Outras Mutações em CFTR.....	111
5.2.2.2	Identificação de Cinco Mutações Novas	112
5.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MUTAÇÕES NÃO IDENTIFICADAS	114
5.3.1	<i>Freqüências e haplótipos de mutações não identificadas neste estudo</i>	114
5.4	ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	115
5.5	DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO MICROSSATÉLITE IVS17bTA.....	116
6	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	120
	LISTA DE APÊNDICES	146
	APÊNDICES	147

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	INCIDÊNCIA DA FC EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	4
TABELA 2.	CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FC.....	7
TABELA 3.	FORMAS ATÍPICAS DE APRESENTAÇÃO DA FC.....	7
TABELA 4.	CLASSES DE MUTAÇÕES EM CFTR.....	45
TABELA 5.	CONDIÇÕES DE PCR E OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DOS 27 ÉXONS DO GENE CFTR E SUAS SEQÜÊNCIAS INTRÔNICAS FLANQUEANTES.....	54
TABELA 6.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA OS SEIS MARCADORES GENÉTICOS ANALISADOS.....	58
TABELA 7.	ENZIMAS UTILIZADAS NA DIGESTÃO, O TEMPO DE CORRIDA DE CADA ÉXON E O TAMANHO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS PARA OS ÉXONS ANALISADOS POR SSCA.....	61
TABELA 8.	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, GRADIENTE DE DESNATURAÇÃO, VOLTAGEM, TEMPERATURA E TEMPO DE CORRIDA PARA OS ÉXONS ANALISADOS POR DGGE.....	63
TABELA 9.	FREQÜÊNCIA ALÉLICA DOS MARCADORES IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/AVA II, IVS17bTA, E IVS17bCA.....	76
TABELA 10.	COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS.....	79
TABELA 11.	COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS.....	81
TABELA 12.	COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS17bTA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS.....	82
TABELA 13.	COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS EM EURO-BRASILEIROS.....	83
TABELA 14.	COMPARAÇÃO DAS FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS EM AFRO-BRASILEIROS.....	84

TABELA 15.	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8-T(n), ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS E NORMAIS NO GRUPO EURO-BRASILEIRO.....	85
TABELA 16.	COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/ <i>Ava</i> II ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS.....	85
TABELA 17.	FREQUENCIA DAS MUTAÇÕES CFTR DETECTADAS EM INDIVÍDUOS AFETADOS.....	89
TABELA 18.	FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS CFTR DETECTADOS EM INDIVÍDUOS AFETADOS.....	91
TABELA 19.	DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DOS GRUPOS EURO-BRASILEIRO E AFRO-BRASILEIRO.....	92
TABELA 20.	ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES CFTR E OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DO GRUPO EURO-BRASILEIRO.....	94
TABELA 21.	ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES CFTR E OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DO GRUPO AFRO-BRASILEIRO.....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ETAPAS DA CLONAGEM E IDENTIFICAÇÃO DO GENE CFTR.....	13
FIGURA 2.	DISTRIBUIÇÃO DOS ÉXONS DO GENE CFTR.....	16
FIGURA 3.	ESQUEMA DE ESTRUTURA INTERNA DE MICROSSATÉLITE (REPETIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS) DO ÍNTRON 17b DO GENE CFTR.....	17
FIGURA 4.	MARCADORES INTERNOS DE CFTR E SUAS LOCALIZAÇÕES.....	20
FIGURA 5.	VARIANTES DE DNA NO ÍNTRON 8 DO GENE CFTR E SEUS EFEITOS NO RNAm.....	21
FIGURA 6.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA CFTR E DOS DOMÍNIOS QUE A FORMAM.....	26
FIGURA 7.	MODELO DO FUNCIONAMENTO DO GENE CFTR.....	29
FIGURA 8.	DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES FC, POLIMORFISMOS E TIPOS DE MUTAÇÃO EM CFTR.....	33
FIGURA 9.	CONSEQÜÊNCIAS MOLECULARES DAS DIFERENTES CLASSES DE MUTAÇÕES DA FC.....	42
FIGURA 10.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS QUATRO CLASSES DE ANORMALIDADES NO PROCESSAMENTO DA CFTR GERADAS POR MUTAÇÕES EM CFTR.....	43
FIGURA 11.	DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES DETECTADAS NO GENE CFTR NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i> (proteínas que se ligam ao ATP)
ADP	Adenosina Difosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
CBAVD	Agnesia Congênita Bilateral de Vaso Deferente
CFTR	Regulador da Condução Transmembrânica da Fibrose Cística
DGGE	<i>Denaturant Gradient Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em gel com gradiente desnaturante)
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAc	Ácido desoxiribonucléico complementar
dH ₂ O	Água destilada
dNTP	deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido Etileno Tetra-Diamino
FC	Fibrose Cística
HTF	<i>Hpa II Tiny Fragments</i> (ilhas livres de metilação)
IRP	<i>int-1 related protein</i> (proteínas relacionadas a int-1)
kb	quilobases
MAC	<i>Mammalian Artificial Chromosomes</i> (cromossomos artificiais de mamíferos)
mEq/l	Miliequivalente por litro
MG	Minas Gerais
MSD	<i>Membrane Spanning Domain</i> (domínio que atravessa a membrana)
NBF	<i>Nucleotide Binding Fold</i> (dobra de ligação nucleotídica)
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia pela polimerase)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (eletroforese em campo pulasado)
PKA	Proteína A-Quinase
PR	Paraná
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SC	Santa Catarina
SSCA	<i>Single Strand Conformation Analysis</i> (análise de conformação de fita simples)
STR	<i>Short Tandem Repeat</i> (repetições curtas em seqüência)
TE	Tris-EDTA
TIR	Tripsina Imunoreativa

RESUMO

A fibrose cística ou mucoviscidose é a doença genética que mais frequentemente leva a óbito na infância entre os europeus e seus descendentes. A doença é multissistêmica, de expressão variável, e pode iniciar-se a qualquer momento da vida, desde as primeiras horas de nascimento. O presente trabalho tem como objetivo analisar os 27 éxons do gene CFTR sobre o aspecto molecular, buscando a identificação das mutações existentes e identificação dos alelos de marcadores intra-gênicos para se fazer a caracterização da frequência das mutações existentes, dos haplótipos formados pelos marcadores internos do gene CFTR e da correlação existente entre os haplótipos e as mutações em uma amostra de indivíduos afetados de origem europeia (euro-brasileiros) e em outra de indivíduos afetados de origem africana (afro-brasileiros) para que se possa facilitar a identificação de mutações em indivíduos afetados e tornar mais preciso o Aconselhamento Genético de famílias brasileiras com um afetado ou com história familiar de FC. A metodologia utilizada consistiu na obtenção e análise molecular de amostras sanguíneas dos afetados e seus pais, bem como na caracterização do grupo continental em que cada indivíduo estava inserido. A mutação DF508 foi caracterizada como a mais frequente nos dois grupos continentais. No grupo euro-brasileiro outras cinco mutações apresentaram uma frequência superior a 3,5% (G542X - com uma frequência de 6,25% - e N1303K, R334W, R1162X e G85E - com frequências de 3,57%). Ainda neste grupo outras 19 mutações apresentaram frequência variando de 0,89% a 2,65% (2183 AA:G, W1282X, A561E, R553X, Y1092X, 3849+10kb C:T, 711+5G:A, 621+1G:T, G1069R, W1282G, S4X, E585X, 1717-8G:A, 711+1G:T, 1812-1G:A, 1717-1G:A, 232 del 18, R347P, 1898-1G:A). No grupo afro-brasileiro, além da DF508, outras cinco mutações foram encontradas em mais de um cromossomo (3120+1G:A - com uma frequência de 6,52% e G1247R, Q552K, A561E e R1066C - com frequências de 4,35%). Outras sete mutações foram encontradas, estando presentes e apenas um cromossomo cada (N1303K, Y1092X, P5L, 565 del C, I148N, V232D, E504X). A identificação das distintas mutações responsáveis por FC permitiu concluir a análise molecular da doença em 92,86% das famílias do grupo continental euro-brasileiro e em 69,57% das famílias do grupo continental afro-brasileiro. Em relação aos haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA, entre o grupo euro-brasileiro, os mais frequentes foram o 17-31-13 (cromossomos mutados) e o 16-7-17 (cromossomos normais). Entre o grupo afro-brasileiro, os mais frequentes foram o 23-31-13 (cromossomos mutados) e os 16-7-17, 16-30-13 e 16-32-13 (cromossomos normais). O conjunto de mutações FC no grupo continental euro-brasileiro e os haplótipos associados a estas mutações, indicam a presença de um componente Mediterrâneo na formação da população brasileira de origem europeia. Foram identificadas duas novas mutações (232 del 18 e W1282G) e um novo polimorfismo (1716+85C/T) no grupo continental euro-brasileiro. No grupo continental afro-brasileiro foram identificadas cinco novas mutações (565 del C, I148N, E504X, Q552K, e G1247R). A análise de associação entre os alelos dos marcadores intra-gênicos IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA (e haplótipos formados por estes) mostrou-se importante facilitador na identificação de mutações. Em suma, a caracterização das frequências alélicas e haplotípicas das mutações e dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA permitem que o Aconselhamento Genético de famílias brasileiras com um afetado ou com história familiar de FC seja realizado de maneira bem mais rápida e precisa.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis or mucoviscidosis is the genetic disease that most frequently leads to death in infancy, among European and their descendants. It is a multi-systemic disease, with variable expression, and may start at any moment in life, since the newborn period. In Brazil, infectious diseases lack proper attention from health authorities. The goal of the present study is to analyze the molecular aspects CFTR gene's 27 exons, looking for the mutations and identifying the alleles presents in the CFTR gene internal markers, to make the characterization of the mutations frequency, the haplotypes formed by the CFTR gene internal markers and the correlation existent between the haplotypes and mutations in a sample from affected individual with European ascendancy (Euro-Brazilians), and in an another sample from affected individual with African ascendancy (Afro-Brazilians), to facilitate the identification of the mutation in affected individuals and make more accurate the Genetic Counseling of Brazilian families with an affected member or familiar history of cystic fibrosis. The methodology used consist in the obtention and the molecular analysis of the affected and their parents, and do the characterization of continental group from each individual. The DF508 mutation was the most frequent in both continental groups. In the Euro-Brazilian group another five mutations have the frequency greater than 3.5% (G542X - with a 6.25% frequency - and N1303K, R334W, R1162X and G85E - with a 3.57% frequency). Still in these group another 19 mutations have the frequency between 0.89 and 2.65% (2183 AA:G, W1282X, A561E, R553X, Y1092X, 3849+10kb C:T, 711+5G:A, 621+1G:T, G1069R, W1282G, S4X, E585X, 1717-8G:A, 711+1G:T, 1812-1G:A, 1717-1G:A, 232 del 18, R347P, 1898-1G:A). In the African-Brazilian group, without the DF508 mutation, five mutations were found in two or more chromosomes (3120+1G:A - with a 6.25% frequency - and G1247R, Q552K, A561E and R1066C - with a 4.35% frequency). Another seven mutations were found only in one chromosome each (N1303K, Y1092X, P5L, 565 del C, I148N, V232D, E504X). The identification of distinct mutations responsible for the cystic fibrosis allowed conclude the sickness molecular analysis in 92.86% from the Euro-Brazilian group families, and in 69.57% from the Afro-Brazilian group families. About the formed haplotypes by the IVS8CA, IVS17bTA, and IVS17bCA markers, in the Euro-Brazilian group, the most frequent were the 17-31-13 (mutate chromosome) and 16-7-17 (normal chromosome). In the African-Brazilian group the most frequent were the 23-31-13 (mutate chromosome) and the 16-7-17, 16-30-13 and 16-32-13 (normal chromosome). The cystic fibrosis mutations complete set in the Euro-Brazilian group and the mutations associate haplotypes indicate the Mediterranean component present in the European origin Brazilian population formation. Two new mutations were identifying (232 del 18 and W1282G) and a new polymorphism (1716+85C/T) in the Euro-Brazilian group. In the Afro-Brazilian group five new mutations were identify (565 del C, I148N, E504X, Q552K, and G1247R). The association analysis among IVS8CA, IVS17bTA, and IVS17bCA markers alleles (and they formed haplotypes), proved to be important facilitator in the mutation identification. In short, the frequencies characterization of the alleles haplotypes from mutation and IVS8CA, IVS17bTA, and IVS17bCA markers permit faster and more precise Genetic Counseling of Brazilian families with an affected member or familiar history of cystic fibrosis

1 Introdução

A fibrose cística (FC) ou mucoviscidose é a doença hereditária autossômica recessiva grave mais freqüente na população de origem caucasóide, com uma incidência média de 1 em 2.500 nascidos vivos e uma freqüência de portadores de 1 em 25 (BOAT; WELSH; BAUDET, 1989). Os heterozigotos ou indivíduos portadores de uma mutação no gene da fibrose cística são clinicamente normais, não apresentando nenhuma sintomatologia da doença. No Brasil, até o momento não foi realizado nenhum estudo amplo o suficiente sobre a incidência da fibrose cística, principalmente devido ao tamanho da população, ao fato de que em muitas localidades o diagnóstico ainda é deficitário e de que existe uma heterogeneidade muito grande na população brasileira. Estes fatores indicam que a incidência da fibrose cística provavelmente possa ser bastante distinta entre as regiões, o que já é observado com relação as mutações $\Delta F508$, G542X, G551D, N1303K e W1282X (RASKIN e cols., 1993; 1999).

A clínica da fibrose cística se inicia geralmente nos primeiros anos de vida e se caracteriza por uma disfunção generalizada das glândulas exócrinas (principalmente do aparelho respiratório e do trato gastrointestinal), insuficiência pancreática, níveis elevados de eletrólitos no suor e infecção crônica e obstrução do aparelho respiratório. Devido a grande variabilidade da sintomatologia clínica e da elevada taxa de mortalidade infantil, foi praticamente desconhecida até o início do século XX.

Entre 1650 e 1800 numerosos autores descreveram casos de insuficiência pancreática em crianças (TAUSSIG, 1984). Em 1857 já havia referências na literatura científica alemã sobre crianças que tinham excesso de suor salgado nas sobrancelhas e morriam cedo (WOOD; BOAT; DOERSHUK, 1976).

A primeira descrição da fibrose cística foi realizada por Landsteiner em 1905. Entretanto a doença não foi reconhecida até o final dos anos 30, quando Fanconi e

Anderson descrevem as alterações patológicas de pulmões e pâncreas, típicas de pacientes com fibrose cística (FANCONI; UEHLINGER; KNAUER, 1936; ANDERSON, 1938). Mais tarde, FARBER (1945) sugeriu que a fibrose cística se devia a um transtorno generalizado na secreção das glândulas mucosas, especialmente dos aparelhos respiratório e gastrointestinal. Em 1953, di SANT'AGNESE e cols. observaram, no suor de praticamente todos os indivíduos com fibrose cística, níveis excessivamente elevados de sódio e cloro. Posteriormente, se demonstrou que o transporte anômalo de cloro e sódio altera as propriedades elétricas das células epiteliais respiratórias (KNOWLES e cols., 1983) e que a permeabilidade do cloro através da membrana celular de glândulas salivares é 40 vezes menor em afetados por fibrose cística do que em normais (QUINTON, 1983).

A alta frequência de portadores na civilização ocidental (5%) sugere que a FC não seja uma doença recente. O conhecimento molecular da doença permitiu recentemente estimar que a primeira mutação no gene selvagem da FC ocorreu há cerca de 52 mil anos atrás, portanto, após a divergência dos três grandes grupos continentais, explicando porque a incidência da doença é muito maior no grupo continental europeu do que nos outros grupos (MORRAL e cols., 1993a).

Não se tinha nenhuma evidência sobre o gene responsável da doença até que em 1985, diferentes grupos localizaram, mediante análise de ligação genética, o *locus* do gene da fibrose cística no cromossomo 7 (banda 7q31) (TSUI e cols., 1985; WAINWRIGHT e cols., 1985; WHITE e cols., 1985). Finalmente em 1989 o gene da fibrose cística foi clonado e caracterizado, e a mutação mais freqüente ($\Delta F508$), identificada (KEREN e cols., 1989b; ROMMENS e cols., 1989; RIORDAN e cols., 1989). Desde então, se tem demonstrado que o gene codifica para uma proteína de membrana chamada Regulador da Condução Transmembrânica da Fibrose Cística (CFTR) que atua como um canal de cloro, regulado por ATP e ADP (ANDERSON e cols., 1991a; 1991b; 1991c).

Em 1992 começaram os primeiros experimentos em terapia gênica: conseguiu-se inserir ADNc-CFTR humano em células epiteliais de trato respiratório de rato, buscando a correção do transporte de cloro (ROSENFELD e cols., 1992). Atualmente

vários grupos começaram a aplicar terapia gênica diretamente em humanos afetados por fibrose cística, detectando a expressão, mesmo que por um curto período de tempo, de uma proteína CFTR funcional em células do trato respiratório, sendo que os grupos pioneiros foram ALTON e cols. (1993) e ZABNER e cols. (1993).

As estratégias e esforços futuros estão sendo dirigidos para conseguir uma maior eficiência, especificidade e persistência da resposta a terapia gênica e a uma total correção do fenótipo FC.

1.1 Incidência

Das doenças genéticas que na maioria dos casos levam ao óbito ainda na infância, a FC é a doença autossômica recessiva mais comum entre os indivíduos oriundos primariamente da Europa, com uma incidência que varia de 1:2000 a 1:8000 nesta população e em seus descendentes (tab. 1). Exemplos de alta incidência, atribuída à deriva genética, são observados em certas partes do Reino Unido (1:377), e entre a população Amish norte americana (1:640 a 1:1.200) (TAUSSIG, 1984). Na população européia, as maiores incidências são encontradas nas Ilhas Britânicas (1:2.000) e na França (1:2.500). A incidência decresce para o norte (1:3.700 na Bélgica e Holanda, 1:4.700 na Dinamarca e 1:6.300 na Noruega e Suécia). Decresce também para o oeste (1:3.200 na Alemanha, 1:6.000 na Polônia) e para o sul (1:3.500 na Itália, Espanha e Grécia) (BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992).

A incidência da FC é muito baixa nas populações não-caucasóides (indianos, árabes, asiáticos e entre judeus africanos), bem como entre os índios americanos, os negros africanos e americanos, e os orientais (TAUSSIG, 1984). Apesar de dados pouco precisos, calcula-se uma incidência de 1:15.300 nos negros norte-americanos (HAMOSH e cols., 1998), enquanto são poucos os casos descritos em negros na África (CARLES e cols., 1996). Os dados sobre os povos orientais revelam uma incidência de 1:90.000 na população oriental do Hawai (WRIGHT; MORTON 1968), de 1:100.000

na comunidade oriental da Grã-Bretanha e pouquíssimos casos descritos no Japão (WELSH e cols., 1995).

TABELA 1. INCIDÊNCIA DA FC EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS

País	Incidência	Referências
Alemanha	1:3.300	VIVELL; JACOBI; MÜNCHBACH, 1963
África do Sul	1:6.500	SUPER, 1979
Afro-Americanos	1:15.300	CUTTING, 1997
Americanos asiáticos	1:32.100	CUTTING, 1997
Americanos nativos	1:1.500 a 1:3970	CUTTING, 1997; HAMOSH e cols., 1998
Austrália	1:2.450 a 1:2.550	DANKS; ALLAN; ANDERSON, 1965; DANKS e cols., 1983
Bélgica	1:3.700	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Brasil	1:7.576	RASKIN, 2001
Checoslováquia	1:2.600 a 1:3.300	HOUSTEK; VÁVROVÁ, 1967; BRUNECKY, 1972
Dinamarca	1:4.700	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Emirados Árabes		FROSSARD e cols., 1999
Espanha	1:3.500	LUCOTTE; HAZOUT; BRAEKELEER, 1995
E.U.A.: caucasóides	1:1.900 a 1:3.700	STEINBERG; BROWN, 1960; KRAMM e cols., 1962; MERRITT e cols., 1962; SULTZ; SCHLESINGER; MOSHE, 1966
E.U.A.: negróides	1:17.000	KULCZYCKI; SCHAUF, 1974
Finlândia	1:25.000	KERE e cols., 1994
França	1:1.800	BOIS e cols., 1978
	1:2.500	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Grécia	1:3.726	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Havaí: caucasóides	1:3.800	WRIGHT; MORTON, 1968
Havaí: nativos	1:90.000	WRIGHT; MORTON, 1968
Ilhas Britânicas	1:2.000 a 1:2.500	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Inglaterra: asiáticos	1: 10.000	GOODCHILD e cols., 1974
Inglaterra: caucasóides	1:2.400 a 1:3.000	CARTER, 1967; PUGH; PICKUP, 1967; HALL; SIMPKESS, 1968
Irlanda do Norte	1:1.700 a 1:1.900	STEVENSON, 1959; NEVIN; NEVIN; REDMOND, 1979
Israel	1:5.000	LEVIN, 1963
Itália	1:2.000	ROMEO e cols., 1985
	1:2.000 (1:3.000)	LUCOTTE; HAZOUT; BRAEKELEER, 1995
México	1:8.000 a 1:9.000	GREBE e cols., 1994
Polônia	1:6.000	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Portugal	1:3.500	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992
Suécia	1:7.700	SELANDER, 1962
URSS (antiga)	1:4.900	BRAEKELEER; DAIGNEAULT, 1992

A incidência da FC em indivíduos Europeus e em seus descendentes, obtida a partir de estudos retrospectivos, é avaliada em 1 caso entre 500-3000 nascimentos (WARWICK, 1978; THOMSON, 1980; WELSH e cols., 1995). No entanto, estudos baseados na triagem neonatal para a identificação de níveis elevados de tripsina no

sangue mostram incidência entre 1:1800 e 1:6900 (KING e cols., 1979). Deve-se enfatizar que na triagem neonatal há o risco de passarem despercebidos um certo número de casos. Se reunirmos os resultados retrospectivos com os da triagem neonatal pode-se estimar a incidência na população caucasóide em 1/2500, embora em alguns países seja menor tal como 1:3.500 na Espanha, 1:3.300 na Alemanha e 1:7.700 na Suécia (THOMSON, 1980; WELSH e cols., 1995; KING e cols., 1979) (tab. 1). No entanto, graças à análise direta das alterações moleculares na população, a incidência real da FC poderá ser conhecida com mais exatidão.

A proporção de indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino afetados ou portadores é igual, não havendo evidência de segregação distorcida para os alelos da FC (KITZIS e cols., 1988; EWGCFG, 1995).

No Brasil não existe nenhum estudo epidemiológico ou de triagem neonatal abrangente que estime a incidência da doença nas diversas regiões do país. Há estimativas de que menos de 10% do total anual de doentes são diagnosticados, conferindo uma impressão errônea de incidência baixa na população brasileira (REGLAFQ, 1992). Os poucos estudos realizados até o momento no país (MACRI e cols., 1991; GAIDZINSKI, 1992; REIS; CAMARGOS; ROCHA, 1998; CAMARGOS; GUIMARÃES; REIS, 2000) refletem a situação em um pequeno número de afetados de uma única cidade ou estado. RASKIN (2001) analisou uma amostra de 262 afetados euro-brasileiros de cinco estados diferentes e 38 afetados afro-brasileiros, sendo o trabalho mais abrangente realizado até o momento. A análise epidemiológica não apresentou diferenças estatisticamente significantes quando comparada a resultados obtidos em outras populações quando aspectos como íleo meconial, insuficiência pancreática, infecção por *Pseudomonas*, polipose nasal e doença pulmonar são observados (DONNISON; SCHWACHMMAN; GROSS, 1966; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 1997; 2000; ERCF, 1998; AMÉRICA LATINA, 1996; FITZSIMMONS, 1992; REGLAFQ, 1997; HAMOSH e cols., 1998).

Recentemente, CAMARGO NETO e cols. (1998) realizaram trabalho de triagem neonatal em uma amostra do estado do Rio Grande do Sul, estimando uma

incidência de FC de um caso para cada 2.800/3.000 nascidos vivos, dado bastante semelhante ao de alguns dos países europeus.

O trabalho mais amplo realizado até o momento em triagem neonatal para a FC foi realizado através da análise bioquímica (dosagem de TIR) e molecular (análise da mutação $\Delta F508$) na mesma gota de sangue por RASKIN (2001). A mutação $\Delta F508$ foi pesquisada em 201 amostras provenientes de 16.925 indivíduos submetidos ao “teste do pezinho” com rastreamento positivo para TIR. Foram detectados 7 heterozigotos para $\Delta F508$, ou seja, 1 para cada 29 recém-nascidos com TIR positiva era heterozigoto, e um em cada 2.418 recém-nascidos rastreados para TIR era heterozigoto para $\Delta F508$ (RASKIN, 2001). Este estudo estimou que a incidência de FC encontrada entre euro-brasileiros é bastante distinta entre estados, variando de 1:1.587 a 1:32.258, sendo a incidência média dos 5 estados estudados estimada em 1:7.576 (com intervalo de confiança de 3.633 a 15.802).

1.2 Aspectos Clínicos

A fibrose cística é uma doença multissistêmica que afeta principalmente o aparelho respiratório, digestivo e reprodutor. Devido a isto pode confundir-se em algumas ocasiões com outras doenças. A alteração no transporte de eletrólitos (principalmente do cloro) causa um aumento da viscosidade das secreções mucosas, provocando obstruções crônicas e danos irreversíveis nas vias respiratórias, pâncreas e aparelho reprodutor masculino.

A FC pode se manifestar de diferentes formas, simulando várias entidades clínicas, conforme indicado na tabela 2 e na tabela 3. As manifestações mais comuns incluem tosse persistente e presença de infiltrados pulmonares refratários ou recorrentes. Manifestações gastrointestinais, tais como íleo meconial, ocorrem em aproximadamente 10% dos pacientes, assim como déficit de crescimento acompanhado de esteatorréia.

TABELA 2. CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE FC

1 - Manifestações típicas pulmonares e/ou
2 - Manifestações típicas gastrointestinais e/ou
3 - História típica da doença em parente próximo, mais
4 - Concentração de Cloreto no suor acima de 60 mEq/l

FONTE: WELSH e cols., 1995.

TABELA 3. FORMAS ATÍPICAS DE APRESENTAÇÃO DA FC

Manifestações respiratórias
Bronquiolite/asma
Pneumonia estafilocócica
Colonização do trato respiratório por <i>Pseudomonas</i>
Pólipos nasais
Manifestações gastrointestinais
Prolapso retal/Síndrome da rolha meconial
Dor abdominal recorrente e/ou massa no quadrante inferior direito
Icterícia neonatal prolongada/Edema hipoproteico
Deficiência vitamínica (A, D, E, K)/Cirrose biliar com hipertensão portal
Acrodermatite enteropática (tipo déficit de zinco e ácidos graxos)
Volvo intra-uterino/Pancreatite recorrente
Manifestações gênito-urinárias
Infertilidade masculina
Infertilidade feminina
Outras manifestações
Alcalose hipoclorêmica, hiponatrêmica
Mãe com um filho afetado por FC

FONTE: WELSH e cols., 1995.

Pacientes com história familiar positiva de FC podem ser diagnosticados ao início dos sintomas ou até antes do início dos sintomas através das técnicas de biologia molecular. Um número considerável de pacientes pode ter o diagnóstico retardado ou passarem despercebidos nas primeiras décadas de vida devido às formas atípicas de apresentação ou por desconhecimento dos sinais da doença pelos profissionais da área de saúde (tab. 3).

1.2.1 Aparelho Respiratório

Mesmo que a mortalidade dos afetados por fibrose cística esteja intimamente relacionada com insuficiência respiratória e complicações pulmonares durante a infância e a etapa adulta, a maioria dos recém nascidos, afetados por fibrose cística, têm pulmões normais. Este fato surpreende devido à alta taxa de expressão do gene CFTR no pulmão fetal, constituindo o chamado paradoxo pulmonar (TIZZANO; CHITAYA; BUCHWALD, 1993). Portanto, ou a secreção de eletrólitos no pulmão fetal pela proteína CFTR não é importante para o funcionamento celular, ou a deficiência da secreção de cloro AMPc-dependente se compensa com outros mecanismos da secreção de cloro (WAGNER e cols., 1991).

Depois do nascimento, as lesões pulmonares, devido a obstruções dos brônquios e bronquíolos por secreções mucosas, se desenvolvem rapidamente, provocando uma diminuição da capacidade vital pulmonar (LEVISON; GODFREY, 1976). Assim mesmo, se produzem com freqüência bronquites agudas e infecções recorrentes ou crônicas, devido principalmente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*. Progressivamente, e como resultado das obstruções das vias respiratórias e dos sucessivos episódios de infecção, se produz a destruição do parênquima pulmonar, o que provoca hipertensão pulmonar e insuficiência respiratória, as quais evoluem para insuficiência cardíaca, ou *cor pulmonale*, que é a causa mais freqüente de morte em afetados por fibrose cística.

1.2.2 Aparelho Digestivo

Os problemas pancreáticos se detectam em 85% dos pacientes. Esta proporção parece ser maior nos primeiros meses de vida do que no período neonatal, o que indica que o deterioramento da função pancreática aumenta depois do nascimento e que deve ser influenciada por outros fatores (WATERS e cols., 1990).

As lesões anatomopatológicas variam desde alterações mínimas por obstrução dos condutos pancreáticos até a substituição das áreas afetadas por tecido fibroso e

gordura. Como conseqüência da insuficiência pancreática, as enzimas pancreáticas tripsina, lipase e amilase não se deslocam ao duodeno nas quantidades normais. O déficit enzimático prejudica a digestão dos alimentos e a absorção correspondente (especialmente de triglicerídios e vitaminas lipossolúveis), o que produz uma carência de ácidos graxos essenciais e avitaminose. Tudo isto provoca uma mal-nutrição generalizada, distensão abdominal, diarréia crônica com esteatorréia e atraso no crescimento.

Em 10% dos casos pode-se observar nos recém nascidos um quadro de íleo meconial, uma obstrução intestinal devida ao aumento da viscosidade das secreções intestinais por causa da falta de enzimas pancreáticas que em condições normais fariam a digestão e fluidificação do mecônio. Assim mesmo, também se observa em quase todos os indivíduos com fibrose cística uma resposta mais lenta nos níveis de insulina perante a ingestão de glicose. Porém, apenas 8% dos indivíduos desenvolvem diabetes e necessitam a administração de insulina (RODMAN; MATTHEWS, 1981).

1.2.3 Aparelho Reprodutor

Noventa e cinco por cento dos pacientes do sexo masculino afetados por fibrose cística são estéreis devido a obstrução do trato genital por secreções mucosas no período embrionário. Os condutos de Wolff não se desenvolvem de forma normal, enquanto que o cordão espermático, as vesículas seminais e o epidídimo estão atrofiados ou ausentes, o que provoca a completa ausência de espermatozóides no sêmen. A fertilidade nas mulheres (ao redor de 10%) é mais elevada que nos homens, mesmo que também esteja alterada pela presença de um muco cervical espesso e desidratado que poderia afetar a migração normal dos espermatozóides.

1.2.4 Glândulas Sudoríparas

Uma das alterações mais características da fibrose cística é a elevada concentração de cloro, sódio e potássio no suor (entre duas e cinco vezes com relação

aos níveis normais). O número e a estrutura das glândulas sudoríparas é normal, porém o transporte de eletrólitos através dos condutos da glândula está alterado. Os níveis excessivos de cloro no suor se utilizam como valor de referência na hora de se realizar o diagnóstico da doença.

1.2.5 Diagnóstico e Tratamento

Determinado indivíduo é suspeito de que tenha a fibrose cística quando apresente algumas das alterações descritas anteriormente, sendo que nem sempre se detectam todas ao mesmo tempo. O diagnóstico se estabelece mediante a prova do suor, que consiste na medida dos níveis de cloro. Quando a concentração do cloro é maior que 60 mEq/l se confirma o diagnóstico. Aproximadamente 98% dos pacientes afetados por fibrose cística têm a prova do suor positiva. Nos pacientes com valores inferiores é necessário realizar ou uma prova de secreção pancreática ou a quantificação, por radioimunoanálise, dos níveis de tripsina sérica.

A esperança de vida dos pacientes com fibrose cística foi prolongada durante os últimos anos, graças ao diagnóstico precoce da doença e aos avanços realizados tanto no tratamento das infecções respiratórias como na nutrição dos pacientes, mediante a administração de enzimas pancreáticas. Tudo isto ocasionou que não somente a esperança média de vida tenha aumentado (atualmente de 50 a 80% dos afetados chegam à idade adulta em países desenvolvidos), como também que se tenha melhorado consideravelmente a qualidade de vida dos doentes.

Dado que o diagnóstico precoce aumenta a vida dos pacientes com FC é necessário realizar uma prova diagnóstica nos recém nascidos que tenham antecedentes familiares ou naqueles em que a doença seja suspeita. Desde a clonagem do gene (KEREM e cols., 1989; ROMMENS e cols., 1989; RIORDAN e cols., 1989) é possível realizar o diagnóstico genético direto da doença, inclusive durante o período intrauterino, em famílias com histórico de FC, o que permite saber se o feto desenvolverá a doença. No caso de não se conhecerem as mutações responsáveis pela

fibrose cística em uma família determinada, é possível realizar um diagnóstico genético indireto mediante a utilização de marcadores genéticos.

Uma vez que se conheçam todas as mutações presentes em uma determinada população, será possível realizar não somente o diagnóstico direto em todos os casos, como também o diagnóstico de portadores na população geral.

1.3 Aspectos Genéticos

Diferentemente das doenças genéticas nas que a análise bioquímica permite detectar a proteína defeituosa, a partir da qual é possível identificar o gene responsável, a fibrose cística não tinha uma proteína previamente caracterizada que facilitasse o isolamento do gene. Para a identificação do gene responsável da fibrose cística foi necessário utilizar técnicas de clonagem posicional, as quais se baseiam (mediante análise de segregação em famílias com afetados) na ligação genética entre marcadores polimórficos e o *locus* responsável pela doença. Uma vez que o gene está delimitado a uma zona reduzida, procuram-se seqüências codificadoras desta região, isola-se o gene e estuda-se sua conservação em distintas espécies (*zoblots*), seu padrão de expressão em distintos tecidos e a sua correlação com a enfermidade.

1.3.1 Clonagem e Identificação do Gene CFTR

Em 1985 encontrou-se ligação genética entre a paraxonase (PON) e a fibrose cística (EIBERG e cols., 1985). Neste mesmo ano, se encontrou um alto grau de ligação genética entre a fibrose cística e um marcador polimórfico de localização desconhecida (DOCRI-917), que posteriormente foi localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q) (KNOWLTON e cols., 1985). Simultaneamente o oncogene MET (WHITE e cols., 1985) e a sonda pJ3.11 (D7S8) (WAINWRIGHT e cols., 1985) mostraram ligação com a FC, observando-se que flanqueavam o *locus* do gene da fibrose cística. Um estudo colaborativo em 200 famílias com fibrose cística permitiu

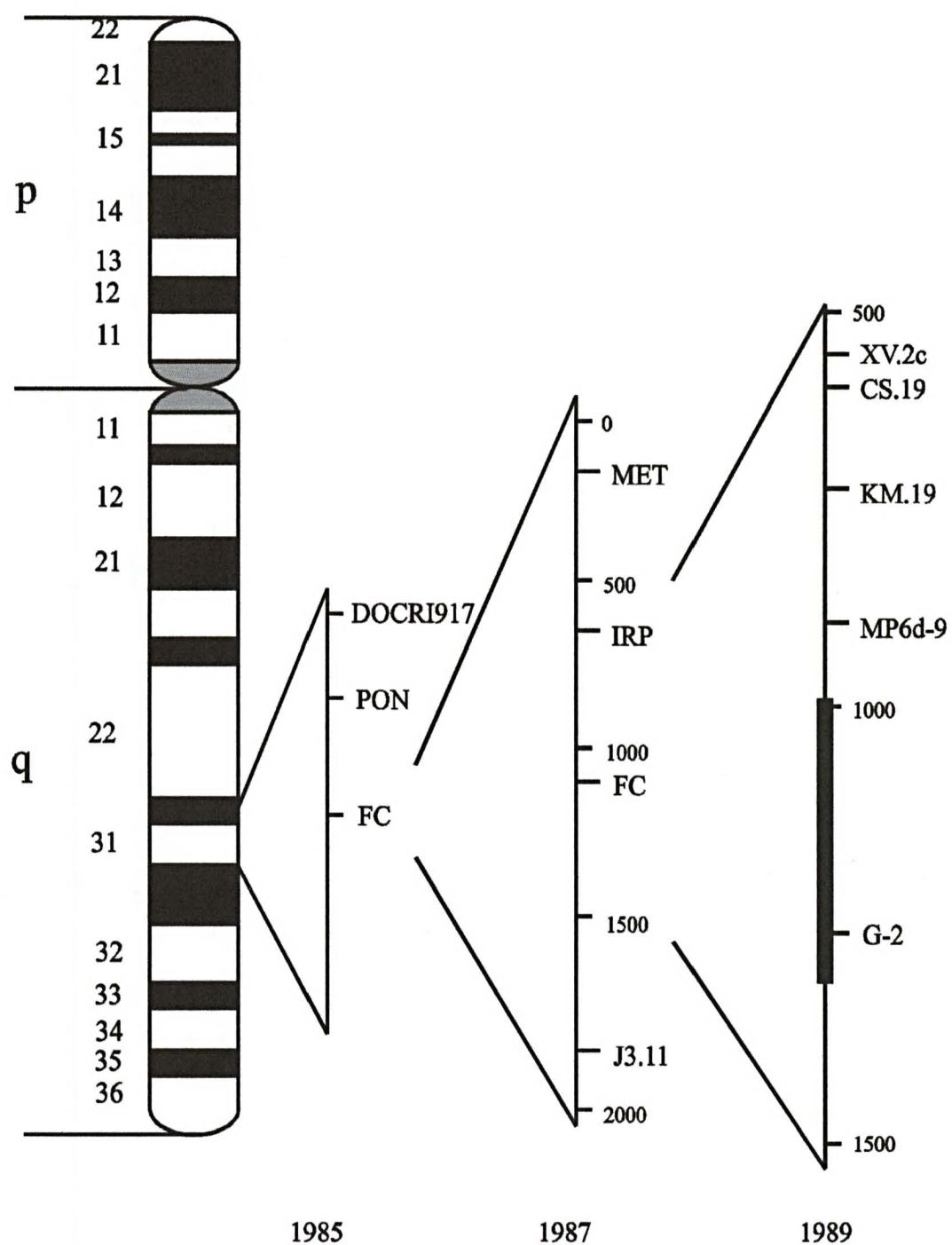
conhecer a ordem destes marcadores: centrômero / MET / *locus* da FC / D7S8 / telômero, sendo a frequência de recombinação entre MET-*locus* da FC e entre *locus* da FC-D7S8 de 1% (BEAUDET e cols., 1986) e a distância estimada de 1.500 kb.

Uma vez que a localização cromossômica é conhecida, o passo seguinte é a identificação do gene. Uma das estratégias utilizadas foi a construção de genotecas de ilhas livres de metilação (*Hpa II Tiny Fragments* - HTF), as quais estão associadas ao extremo 5' da maioria dos genes de transcrição constitutiva (*housekeeping genes*) (BIRD, 1986). São regiões de DNA não metiladas, ricas em dinucleotídeos CpG, e que por isto contém grupos de sítios de restrição para endonucleases de sítios raros sensíveis a metilação. Assim, a análise de ilhas HTF na região do *locus* para a fibrose cística, permitiu ilhar seletivamente genes que devido a sua proximidade física eram candidatos a ser o gene FC.

Utilizando as genotecas de ilhas HTF foram isolados dois marcadores polimórficos, XV-2c e CS7, situados a ambos os lados de uma ilha HTF, localizados a 650-750 kb de MET, que apresentava um forte desequilíbrio de ligação com o *locus* FC (ESTIVILL e cols., 1987a, 1987b). Posteriormente identificou-se um gene associado a esta ilha HTF o qual codificava para uma proteína chamada IRP (*int-1 related protein*), sem relação com a fibrose cística (WAINWRIGHT e cols., 1988). Mais tarde foram localizados na mesma região outros marcadores que também mostravam um forte desequilíbrio de ligação com a fibrose cística (KM.19 e MP6d-9, ESTIVILL e cols., 1987b; 1989a; 1989b; e G-2, RAMSAY e cols., 1990).

Estes marcadores delimitaram a região para o *locus* do gene FC a umas 700 kb (fig. 1). Cerca de 280 kb de seqüência genômica desta região foram clonadas em fagos recombinantes e cosmídios mediante a utilização de diversas técnicas de clonagem molecular como *chromosome walking* e *chromosome jumping* (laboratórios de L. Tsui,

FIGURA 1. ETAPAS DA CLONAGEM E IDENTIFICAÇÃO DO GENE CFTR



F. Collins e J. Riordan). Para confirmar a localização no cromossomo 7 das regiões clonadas, e saber mais especificamente onde estavam, analisaram-se (mediante eletroforese em campo pulsado - PFGE - e comparação de mapas de restrição) por hibridação com linhagens celulares somáticas híbridas de humano-camundongo.

O passo seguinte foi determinar se estes clones continham seqüências codificadoras. Para isto foram analisados por hibridação cruzada com DNA genômico de boi, camundongo, hamster e galinha. Quatro clones mostraram hibridação cruzada positiva com seqüências destas espécies, porém três destes foram eliminados como candidatos para ser o gene FC: dois clones por dados de ligação genética, e o terceiro por não apresentar RNAm em genotecas de DNAc.

A análise do quarto clone revelou a presença de uma ilha HTF sugerindo que poderia conter o terminal 5' de um gene. Um fragmento deste clone (H1.6) foi empregado na análise de uma genoteca de DNAc de células de glândulas sudoríparas de um indivíduo não FC, isolando-se um único clone positivo de 920 pares de base (clone 10-1). Na análise posterior, por hibridação em *Northern* de uma genoteca de DNAc da linhagem celular T84 de câncer de colo, com o clone 10-1, se detectou um transcrito de RNAm de aproximadamente 6,5 kb (ROMMENS e cols., 1989). Para clonar o RNAm completo de CFTR, analisaram-se distintas genotecas de DNAc, isolando-se 18 clones adicionais. A análise da seqüência do DNA destes clones revelou que nenhum deles correspondia a um transcrito de RNAm completo. Entretanto, por sobreposição das regiões comuns observou-se que o RNAm deveria ter 6.129 nucleotídeos e estar formado por 24 éxons. Análises posteriores demonstraram a existência de mais 3 éxons (ZIELENSKI e cols., 1991b).

A localização dos distintos éxons no DNA genômico mostra que o gene compreende uma região de umas 250 kb (RIORDAN e cols., 1989). A proteína correspondente, deduzida a partir da seqüência do DNAc, está composta por 1480 aminoácidos e tem uma estrutura de proteína de membrana típica da superfamília das proteínas ABC (*ATP-Binding Cassette*) (RIORDAN e cols., 1989).

A comparação entre a seqüência do DNAc de clones de indivíduos normais e indivíduos afetados por fibrose cística pôs em evidência que a maioria dos pacientes são portadores da mesma mutação ($\Delta F508$) uma deleção de três nucleotídeos no éxon 10, que provoca a deleção de uma fenilalanina no códon 508 da proteína (KEREM e cols., 1989). Esta mutação foi detectada em 68% dos cromossomos FC analisados, porém não se encontrou em nenhum cromossomo normal. Este fato, junto ao padrão de expressão do RNAm do gene em distintos tecidos, consistente com o prescrito pela patogênese da doença, constitui uma prova decisiva para considerar este gene (CFTR ou *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) como o responsável pela fibrose cística.

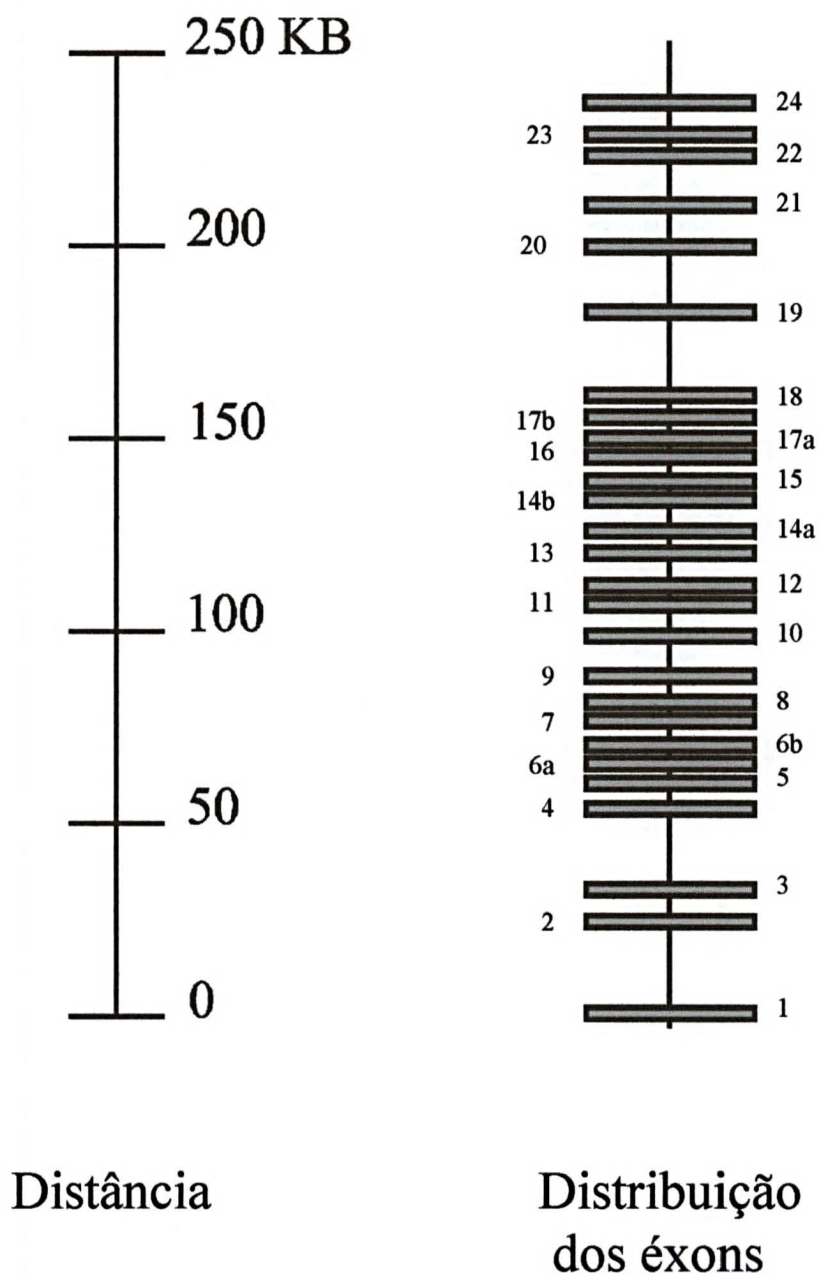
1.3.2 Estrutura do Gene CFTR

O gene CFTR está constituído por 27 éxons espalhados em uma região de 250 kb (fig. 2). A seqüência de nucleotídeos dos éxons e de suas seqüências flanqueadoras é conhecida. A extremidade 5' não codificante é rica em G + C (65% dentro dos 500 pb que precedem o primeiro éxon, no lugar de 40% do genoma humano total - YOSHIMURA e cols., 1991b) e não apresenta seqüências TATA ou CCAAT, apesar de se ter encontrado vários sítios SP1 e AP1 (ZIELENSKI e cols., 1991b). A poliadenilação do transcrito ocorre a 17 nucleotídeos do sinal AATAAA.

A seqüência do gene está altamente conservada em distintas espécies, inclusive as que apresentam grande divergência evolutiva (TUCKER; TANNAHILL; HIGGINS, 1992). O tamanho médio dos éxons é de 200 pb. O éxon 6a é o menor e mede 38 pb, enquanto que o éxon 13 é o maior com um tamanho de 724 pb. O tamanho dos íntrons também é muito diverso variando entre 1,1 kb (íntron 6a) e 40 kb (íntron 3).

A análise das seqüências de *splicing* [processamento (corte e reunião) do RNA mensageiro] no gene CFTR mostrou que estas seguiam a regra invariante de GT-AG (MOUNT, 1982).

FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS ÉXONS DO GENE CFTR



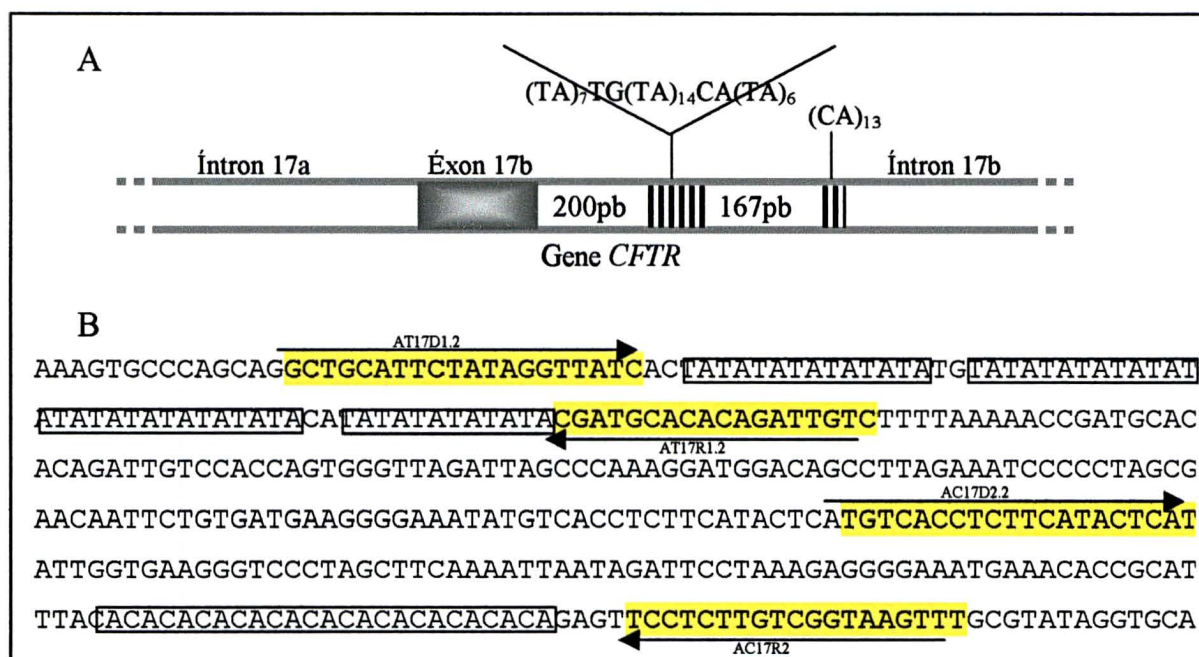
FONTE: modificado de ZIELENSKI; TSUI, 1995

NOTA: os sufixos "a" e "b" presentes na figura são designações históricas

1.3.3 Análise de Marcadores e Desequilíbrio de Ligação

Nos anos de 1991 e 1992 (MORRAL e cols., 1991; MORRAL; ESTIVILL, 1992 e ZIELENSKI e cols., 1991a) foi identificada, dentro do gene *CFTR*, uma classe de DNA repetitivo composta de repetições de poucos nucleotídeos. Esta classe de DNA, já encontrada em diversas regiões do genoma, é chamada de DNA microssatélite ou STRs (*Short Tandem Repeat*). Os STRs possuem uma seqüência núcleo de 2 a 7 nucleotídeos que estão repetidos em seqüência/*tandem* várias vezes. Como o número de repetições varia entre os indivíduos, este tipo de DNA tem sido muito útil em fornecer ampla gama de marcadores moleculares para mapear expansões do genoma humano (fig. 3).

FIGURA 3. ESQUEMA DE ESTRUTURA INTERNA DE MICROSSATÉLITE (REPETIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS) DO ÍNTRON 17b DO GENE *CFTR*



FONTE: modificado de ZIELENSKI e cols., 1991a

NOTA: A: localização de repetições com relação ao éxon 17b. B: seqüência de nucleotídeos da região de repetição, como determinado no clone genômico pTE33IIE4.5. “→” posição e sentido (5'-3') dos primers para amplificação da seqüência TA e CA.

Um exemplo de ligação alélica não aleatória ou de desequilíbrio de ligação pode ocorrer quando um determinado alelo de um marcador segrega preferencialmente com um alelo mutado de um gene. Existe um desequilíbrio de ligação forte entre o alelos da FC e os marcadores intragênicos IVS8CA (localizado no íntron 8), IVS17bTA (localizado no íntron 17b) e IVS17bCA (localizado no íntron 17b) Estes três STRs são repetições de dinucleotídeos (citosina e adenina, nos dois primeiros casos e timina e adenina no último) em tandem, cuja denominação do alelo é dada pelo número de repetições que ele apresenta (por exemplo, o alelo 16 do marcador IVS17bCA apresenta 16 repetições em tandem do dinucleotídeo citosina-adenina) (MORRAL e cols., 1991). Por estes marcadores estarem localizados dentro do gene, aliado ao fato da suposta idade recente das mutações no gene, existe um desequilíbrio de ligação bastante forte entre alelos destes marcadores e alelos do gene CFTR, sendo que já existem trabalhos relacionados à análise destes três marcadores em associação com mutações no gene CFTR, permitindo a observação da transmissão dos alelos mutados em famílias FC, sendo bastante apropriados para estudos pré-natais (CASHMAN e cols., 1995; RUSSO e cols., 1995; HUGHES e cols., 1995; MORRAL e cols., 1996; BRAEKELLER e cols., 1996; HUGHES e cols., 1996; VISICH e cols., 2001; MATEU e cols., 2001).

MORRAL e cols., (1996) fizeram extensa análise destes marcadores em um grupo de indivíduos afetados. Os pacientes selecionados representavam a distribuição de mutações FC em populações do Canadá, França, Alemanha e Espanha. Neste trabalho foi detectada uma grande diferença entre os alelos quando cromossomos normais e mutados são comparados. Esta diferença se mostrou ainda mais acentuada quando haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA foram analisados. Alguns haplótipos se mostraram presentes apenas no grupo de cromossomos afetados e associados a uma mutação específica, como foi o caso do haplótipo 16-24-13, presente em 6 cromossomos e associado exclusivamente a mutação G85E. Observaram também a existência de associação absoluta entre várias mutações FC com haplótipos raros em cromossomos normais, o que favorece a

detecção de mutações pela simples análise de haplótipos destes marcadores. Isto também foi observado por HUGHES e cols. (1996), BRAEKELLER e cols. (1996), VISICH e cols. (2001), entre outros.

Para o marcador IVS8CA já foram descritos 12 alelos distintos (MORRAL e cols., 1991; 1996), sendo que o mais freqüente é o de 16 repetições (MORRAL e cols., 1996; MATEU e cols., 2001). Já o marcador IVS17bTA apresenta um número maior de alelos, tendo sido descrito até o momento aproximadamente 43 alelos (ZIELENSKI e cols., 1991a; MORRAL e cols., 1996), sendo os mais freqüentes os alelos 7, 30 e 31. O marcador IVS17bCA, com apenas 8 alelos descritos, é o que apresenta a menor variabilidade (MORRAL; ESTIVILL, 1992; 1996). Entre estes alelos os alelos 13 e 17 correspondem a mais de 90% da freqüência do marcador IVS17bCA (MATEU e cols., 2001)

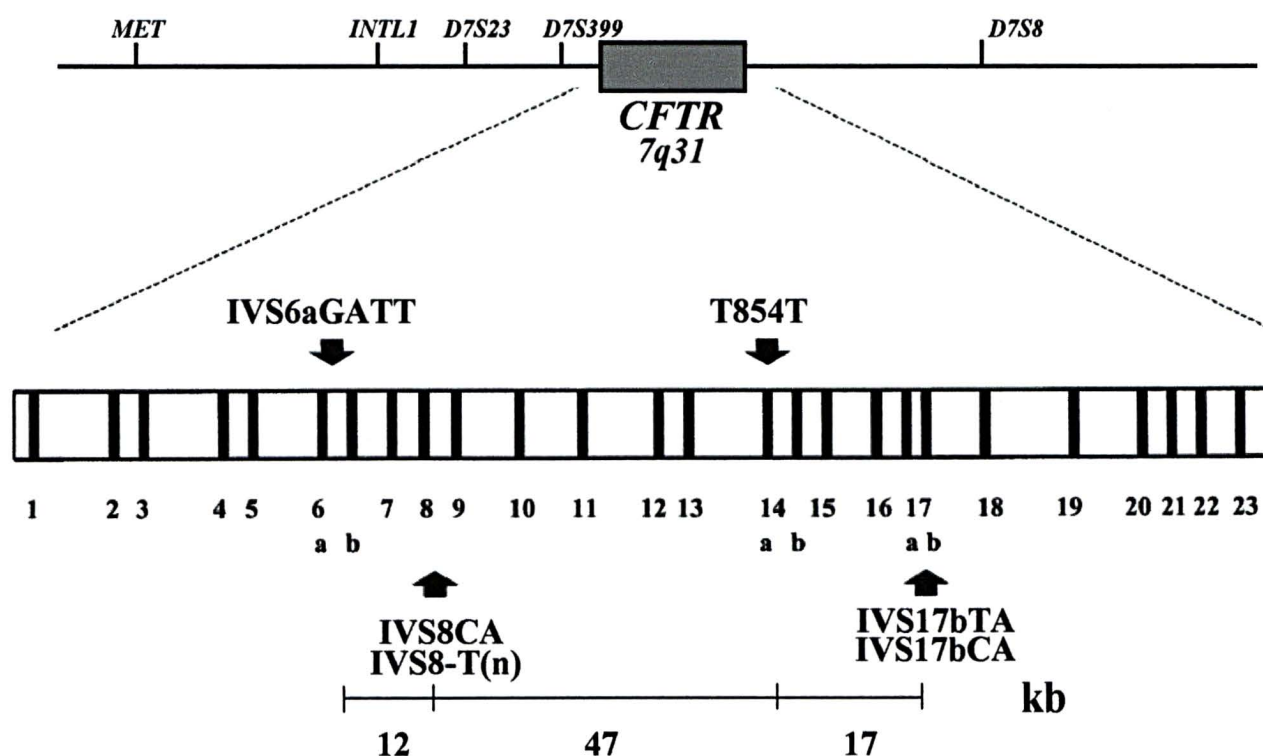
Em populações de origem européia, os haplótipos mais comuns para os microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA, encontrados em cromossomos que não carregam mutações FC, são 16-30-13, 16-32-13 e 16-7-17. As freqüências destes três haplótipos são próximas e em torno de 13%, variando de população para população, sendo que o haplótipo 16-30-13 tem se mostrado o mais freqüente na maioria destas.

Os marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA também têm sido utilizados para traçar a origem e evolução de diferentes mutações FC (MORRAL e cols., 1993a; 1994; BERTRANPETIT; CALAFELL, 1996; SLATKIN; RANNALA, 1997). Estes STRs são usados para se definir a estrutura haplotípica estável na qual a mutação FC ocorreu. Marcadores microssatélites, os quais sofrem mutações mais rapidamente e de maneira distinta de outras regiões do genoma, podem auxiliar a mensurar a variabilidade genética no *locus* CFTR e a idade de mutações FC (MORRAL e cols., 1993a; ESTIVILL e cols., 1997; BERTRANPETIT; CALAFELL, 1996; MATEU e cols., 2002).

Além destes três marcadores, existem outros que são bastante utilizados para a confecção de haplótipos associados a mutações no gene CFTR. Estes haplótipos também apresentam importância no aconselhamento genético de famílias que

apresentam indivíduos afetados. Estes outros marcadores são o IVS6aGATT [um marcador dialélico localizado no íntron 6a, apresentando como núcleo de repetição um tetranucleotídeo (GATT), sendo que os dois alelos mais comuns descritos até o momento apresentam 6 ou 7 repetições e correspondem a mais de 99% da frequência total de alelos deste marcador] (CHEHAB e cols., 1991; GASPARINI e cols., 1991), o polimorfismo¹ T854/*Ava II* (que é uma mutação silenciosa podendo estar presente o nucleotídeo G ou T) (ZIELENSKI e cols., 1991a), e o IVS8-T(n), (conhecido como seqüência poliT, está localizado no íntron 8, e é uma seqüência de polipirimidinas, composta por 5, 7 ou 9 timinas em seqüência, originando os alelos IVS8-5T, IVS8-7T, e IVS8-9T ou simplesmente 5T, 7T ou 9T) (CHU e cols., 1993) (fig 4).

FIGURA 4. MARCADORES INTERNOS DE CFTR E SUAS LOCALIZAÇÕES



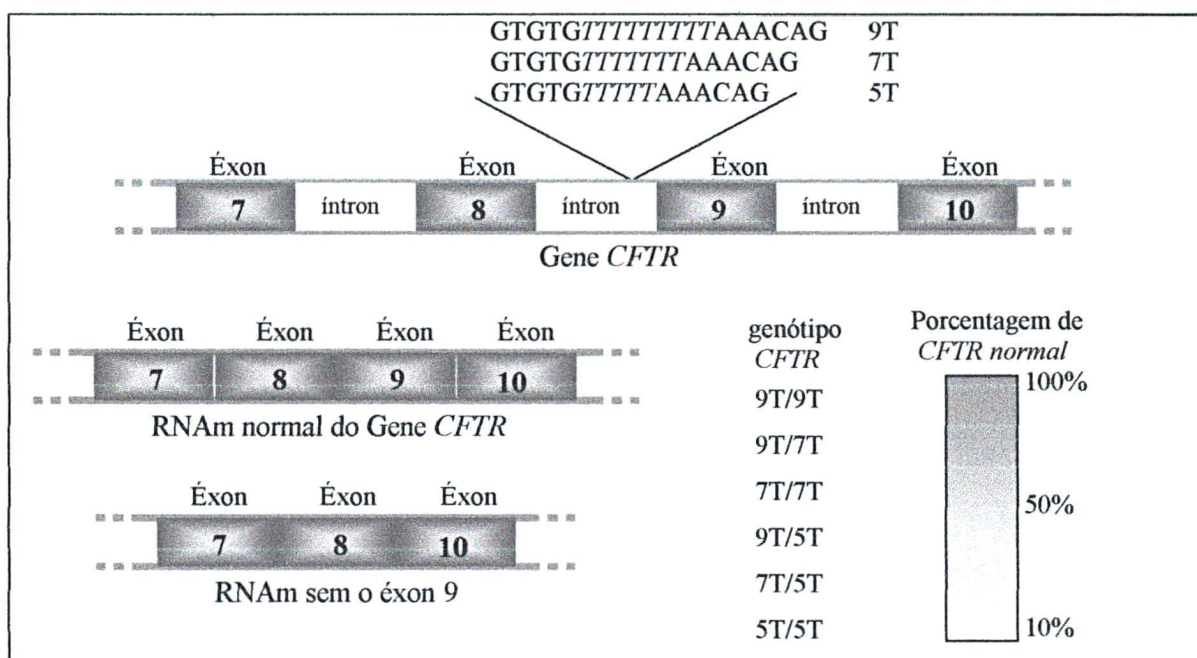
FONTE: modificado de MATEU e cols., 2002

A análise do poliT apresenta uma importância adicional pois o alelo IVS8-5T causa redução dos níveis normais de RNAm de CFTR (CHU e cols., 1993) visto que causa a excisão do éxon 9 do RNAm normal (fig.5) e tem sido muito frequentemente

¹ Variações na seqüência que não são causadoras de fenótipo FC serão designadas por polimorfismo.

encontrado em homens com uma forma de infertilidade chamada de Agenesia Congênita Bilateral de Vaso Deferente (CBAVD) (CHILLÓN e cols., 1995, OATES; AMOS., 1994, PATRIZIO; ZIELENSKI, 1996)

FIGURA 5. VARIANTES DE DNA NO ÍNTRON 8 DO GENE CFTR E SEUS EFEITOS NO RNAm



FONTE: modificado de CHILLÓN e cols., 1995

NOTA: A região do gene *CFTR* que inclui os éxons 7 a 10 é mostrada na parte superior. Durante o processamento, as seqüências não envolvidas na síntese da proteína (íntrons) são eliminadas e as seqüências remanescentes (éxons) sofrem *splice* para que seja formado o RNAm maduro (centro a esquerda). O processamento de *CFTR* não é completamente eficiente, devido ao fato de que de 10 a 92% dos transcritos perdem o éxon 9 (em baixo a esquerda) dependendo do genótipo do indivíduo (CHU e cols., 1993). Quando ambos genes *CFTR* carregam o alelo 5T (o genótipo 5T/5T), a proporção de RNAm normal de *CFTR* é reduzida a aproximadamente 8 a 12% (CHILLÓN e cols., 1995), indicando que quanto mais curta a seqüência de timinas no íntron 8, maior é a proporção de RNAm de *CFTR* nos quais o éxon 9 é perdido.

Mais de 97% das famílias com um afetado vivo poderiam recorrer ao diagnóstico pré-natal com um grau de confiança superior a 99% (BEAUDET e cols., 1989; CASALS e cols., 1991), proporção mais favorável do que nos casos de hemofilia ou nos de hemoglobinopatias (apenas para citar patologias genéticas cujos genes já foram clonados e seqüenciados). O desequilíbrio de ligação também pode ser útil para detectar os portadores nas famílias em que o genoma do indivíduo doente não pode ser estudado. Portanto, pode-se avaliar, nestes casos, o risco de um indivíduo ter herdado o gene da FC em função dos haplótipos presente em familiares.

1.3.4 Expressão do Gene CFTR

1.3.4.1 *Localização da Expressão*

O gene CFTR tem como produto de expressão um RNAm de 6.1 kb que codifica para uma proteína de 1480 aminoácidos. Se expressa principalmente em trato respiratório, trato reprodutor, glândulas sudoríparas, glândulas salivares, pâncreas, fígado, intestino, rim, glândula paratireóide, (RIORDAN e cols., 1989; TREZISE; BUCHWALD, 1991; BREMER e cols., 1992), coração (LEVESQUE e cols., 1992) e linfócitos (YOSHIMURA e cols., 1991a). Não se detecta RNAm do gene em cérebro, glândulas supra-renais fibroblastos e linfoblastos (RIORDAN e cols., 1989). Na maioria dos tecidos analisados, CFTR se expressa na parte apical das células epiteliais (CRAWFORD e cols., 1991), transcrevendo-se a concentrações relativamente baixas de 1 ou 2 cópias por célula (TRAPNELL e cols., 1991).

A expressão do gene CFTR é complexa e está finamente regulada tanto espacial como temporalmente (TREZISE; BUCHWALD, 1991). Entretanto, mesmo que a expressão de CFTR corresponda com a patologia da doença, surpreende a baixa taxa de expressão no trato respiratório (onde se observam às manifestações clínicas mais importantes) e a expressão no rim, onde não se observa sintomatologia de FC.

Mediante hibridação *in situ* pode-se localizar o RNAm de CFTR em uma grande diversidade de tecidos durante o desenvolvimento fetal (TREZISE e cols., 1993; TIZZANO; CHITAYA; BUCHWALD, 1993). Na maioria dos tecidos, o padrão de expressão de CFTR durante o primeiro e segundo trimestre do feto humano é similar ao padrão do adulto, sugerindo que CFTR deve ser funcional já nas primeiras etapas do desenvolvimento (PORTEUS; DORIN, 1993). As principais exceções se produzem nos pulmões e nas glândulas submucosas.

Nos pulmões a expressão parece estar regulada segundo o estágio evolutivo, sendo maior no epitélio do pulmão primordial, mas decrescendo a expressão durante o desenvolvimento dos pulmões (TREZISE e cols., 1993; TIZZANO; CHITAYA;

BUCHWALD, 1993). Isto parece indicar que a proteína CFTR poderia estar envolvida em processos de intercâmbio no pulmão fetal. Entretanto a ausência de um pulmão danificado no nascimento permanece sem explicação (TIZZANO; BUCHWALD, 1993).

Nos testículos, a expressão de CFTR é regulada durante o ciclo do epitélio seminífero. A expressão pós-meiótica é máxima nas espermatídes dos estágios finais, sugerindo que CFTR tem um papel crítico na espermatogênese e que a deficiência de sua função contribui à infertilidade nos homens (TREZISE; BUCHWALD, 1991).

A correlação entre os níveis de expressão do gene e as anomalias presentes no nascimento não é absoluta e a patogênese em indivíduos FC deve, portanto, depender de outros fatores, quer sejam genéticos ou ambientais (TIZZANO; BUCHWALD, 1993).

1.3.4.2 *Regulação da Expressão*

A transcrição de CFTR é um processo complexo no qual intervêm distintos fatores. Assim, mesmo que a transcrição tenha uma regulação típica de tecido e esteja modulada por diversos fatores como fosfocolina e AMPc (BREUER e cols., 1992), ésteres de forbol (TRAPNELL e cols., 1991), proteína quinase C e agentes que influem nos níveis intracelulares de cátions divalentes (BARGON e cols., 1992a; 1992b), a região 5' não codificante do gene tem a estrutura típica dos genes de transcrição constitutiva, com uma alta porcentagem de G + C e sem seqüências de elementos TATA ou CCAAT.

As características estruturais do promotor de CFTR e sua baixa taxa de expressão nas células epiteliais indicam que deveria ser classificado como um gene de transcrição constitutiva. Entretanto, o gene não é transcrito em todos os tipos celulares e, além disto, a proteína CFTR não é essencial para a célula, já que células com apenas proteínas anômalas são viáveis. Portanto, o gene CFTR deveria classificar-se no subgrupo de genes com características estruturais de genes de transcrição constitutiva,

porém com funções específicas de tecidos, estando sua expressão regulada por agentes específicos.

O promotor de CFTR contém seqüências específicas de união ou interação com proteínas nucleares que podem intervir na modulação da transcrição do gene. Assim, se detectam três sítios potenciais de união de fatores de transcrição da família SP1 (seqüências comumente encontradas nos promotores de transcrição constitutiva), quatro sítios potenciais de união com elementos AP-1 (intervém na ativação celular com ésteres de forbol), um sítio potencial de resposta a AMPc e vários sítios potenciais de resposta aos glucocorticóides e ao fator AP2 (YOSHIMURA e cols., 1991b). Entretanto, até o momento, não ficou claramente estabelecido o papel que cada um destes sítios desempenha nas interações DNA-proteína.

Independentemente da regulação direta da transcrição, a expressão do gene CFTR parece estar sujeita a influência de mecanismos indiretos, tais como a metilação diferencial da região promotora (parece haver uma correlação entre um elevado nível de expressão e um baixo grau de metilação da região promotora) e a modificação, específica de tecido, da estrutura da cromatina (regiões promotoras de CFTR de linhagens celulares com um alto nível de expressão do gene são mais facilmente atacáveis por proteínas moduladoras da expressão), sugerindo que o contexto físico do gene CFTR *in vivo* parece contribuir significativamente a uma regulação apropriada da transcrição do gene (KOH; SFERRA; COLLINS, 1993).

1.3.4.3 *Processamento de RNAm*

O *splicing*, corte de íntrons e junção de éxons do pré-RNAm nuclear é um processo altamente regulado no qual os íntrons são eliminados para produzir o RNAm maduro. Primeiro a extremidade 5' do íntron é cortada e ligada pelo spliceossomo ao *branch point site* (nucleotídeo de ramificação), gerando uma molécula intermediária chamada *lariat*. Posteriormente, o corte da extremidade 3' do íntron permite a união dos dois éxons adjacentes e a eliminação do íntron intermediário.

A principal causa de um processo de corte e junção anômalos são as mutações que afetam os sinais de corte e junção, quer sejam 3' ou 5', sendo que entre estas se destacam as mutações 1811+1.6kbA→G e 3849+10kbC→T, que criam novos sítios de corte e junção e dão lugar à aparição de novos éxons (11b e 19b, respectivamente). Nos éxons 4, 9, 11 e 12 (CHU e cols., 1991; BREMER e cols., 1992; SLOMSKI e cols., 1992; WILL e cols., 1993; entre outros) já foram descritos vários casos de corte e junção alternativos. As causas destes processos não são claras. O processo de corte e junção do éxon 9 está associado a uma seqüência de polipirimidinas mais curta e, portanto, menos eficiente (CHU e cols., 1993) (vide item 1.3.3); o do éxon 12 parece ser devido a uma baixa homologia de seqüência de ramificação com a seqüência consenso, enquanto que o processo de corte e junção alternativo dos outros éxons não são conhecidos até o momento (DELANEY e cols., 1996).

Os transcritos alternativos parecem ser um fenômeno geral, já que foram observados em outros genes como o da distrofia muscular de Duchenne (CHELLY e cols., 1990), argininosuccinato (WALKER e cols., 1990) e adenosina-desaminase (KASHII e cols., 1991). Acredita-se que mediante a regulação dos níveis de fatores específicos do processo de corte e junção do RNAm se possa chegar a controlar os padrões de corte e junção do transcrito e, portanto, modular a função da proteína (MONTROSE e cols., 1992).

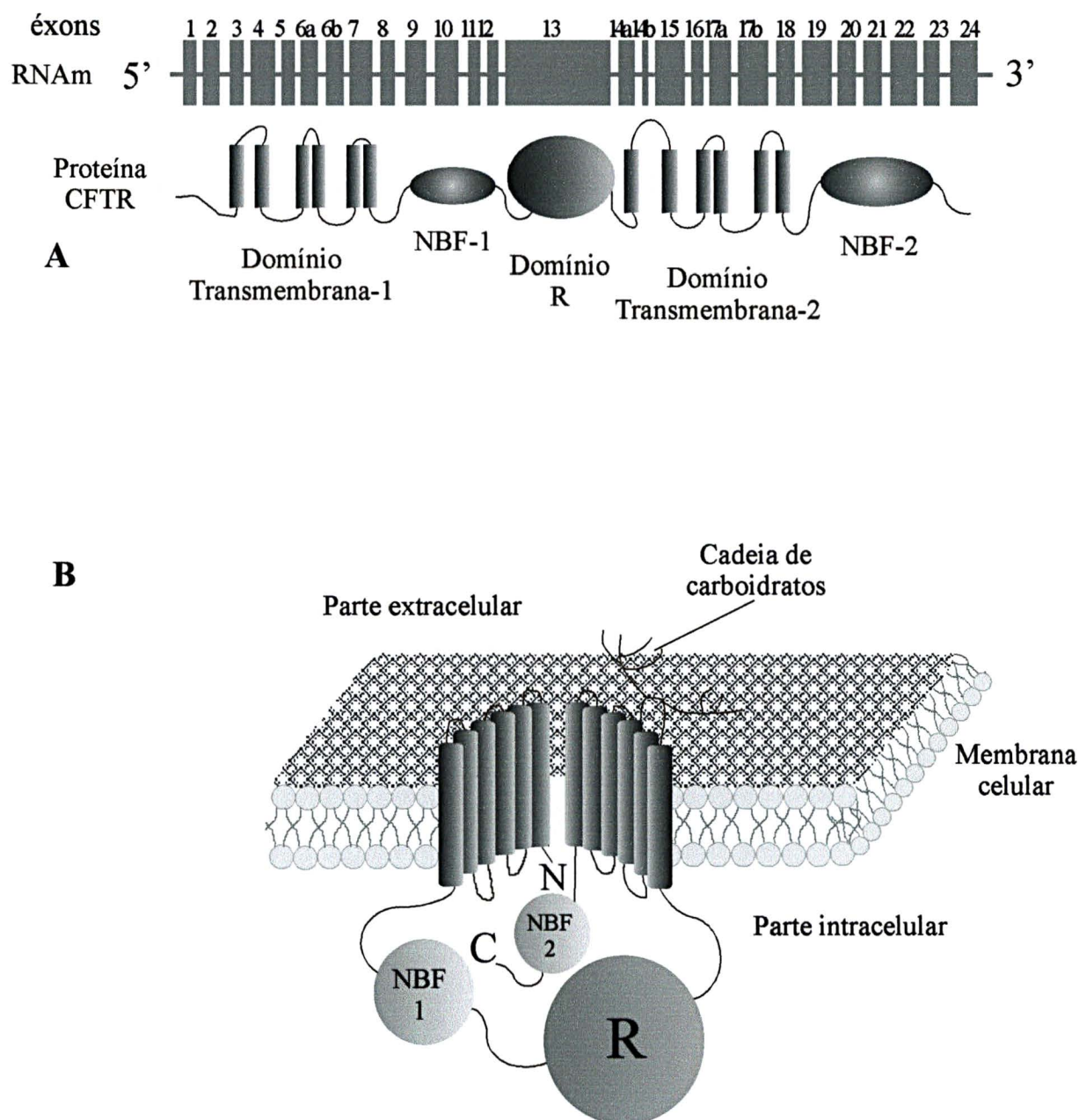
1.3.5 Proteína CFTR

1.3.5.1 Estrutura

O RNAm do gene CFTR codifica para uma proteína de 1480 aminoácidos que, em seu estado maduro e N-glicosilado, tem um peso de 168.138 Daltons. A proteína CFTR está formada por dois domínios repetidos e simétricos compostos cada um por uma região hidrofóbica transmembrana (MSD; *Membrane Spanning Domain*) e uma região hidrofílica que possui uma região de união com ATP (NBF; *Nucleotide*

Binding Fold). Os dois domínios estão unidos pela região citoplasmática R, que intervém na regulação da proteína (fig. 6) (RIORDAN e cols., 1989).

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA CFTR E DOS DOMÍNIOS QUE A FORMAM



FONTE: modificado de ZIELENSKI; TSUI, 1995

NOTA: os sufixos "a" e "b" presentes na figura são designações históricas

A: Representação esquemática do RNAm com os 27 éxons e sua equivalência com a proteína CFTR; B: Representação esquemática tridimensional da disposição da proteína CFTR na membrana celular.

A seqüência de aminoácidos de CFTR revela uma forte homologia com a família de proteínas *ATP-Binding Cassette* ou ABC (presentes em organismos tão diversos como bactérias, *Drosophila* e mamíferos), as quais estão envolvidas no transporte de moléculas através da membrana celular (RIORDAN e cols., 1989).

As proteínas da família ABC têm em comum a existência de uma a quatro regiões hidrofóbicas transmembrana (cada uma formada geralmente por seis segmentos hidrofóbicos transmembrana), que ancoram a proteína a membrana celular e contribuem para a formação do canal, e uma ou duas regiões NBF que são o sítio de união e hidrólise do ATP e proporcionam a energia necessária para o transporte (BREMER e cols., 1992). A proteína CFTR é formada por duas regiões transmembrana e dois NBF além de um domínio regulador central (domínio R), presente somente em CFTR, o qual possui vários sítios de fosforilação para a proteína A-Quinase (PKA), assim como numerosos resíduos polares dispostos alternativamente em grupos carregados positiva e negativamente (RIORDAN e cols., 1989; CHENG e cols., 1991).

Mesmo que a homologia estrutural entre os dois domínios de CFTR sugira uma relação evolutiva entre eles, a escassa homologia de seqüência, exceto entre os dois NBF, vai contra esta possibilidade (RIORDAN e cols., 1989), indicando que as duas metades de CFTR não são derivadas uma da outra por uma duplicação recente do gene (ZIELENSKI e cols., 1991a).

1.3.5.2 Funções

CFTR intervém na passagem de cloro através da membrana celular. Isto foi demonstrado por numerosos experimentos: a introdução de moléculas de RNAm de CFTR normal em células FC é suficiente para corrigir o defeito no transporte de cloro (DRUMM e cols., 1990; RICH e cols., 1990); a introdução de RNAm de CFTR em tipos celulares que normalmente não expressam CFTR provocam a ativação na condução do cloro por AMPc (DRUMM e cols., 1991; TABCHARANI e cols., 1991);

e, sobretudo, a incorporação de proteína pura CFTR normal (BEAR e cols., 1991), ou com a mutação $\Delta F508$ (LI e cols., 1993) em uma membrana artificial, provocou o aparecimento de um canal de cloro ativado por AMPc de características idênticas à CFTR.

A mutagênese de determinados aminoácidos da zona transmembrana faz com que a permeabilidade relativa de CFTR a iodetos, cloretos, brometos e fluoretos fique alterada. Esta ação seletiva sobre íons específicos é mais bem explicada se se considera CFTR como uma proteína que atua principalmente na passagem de íons, mais que como uma proteína reguladora que atua sobre outro canal (ANDERSON e cols., 1991a). Assim mesmo, observou-se que é necessário apenas a primeira metade da proteína CFTR para formar um canal de cloro de características transportadoras similares as da proteína CFTR normal, porém com uma regulação distinta (SHEPPARD e cols., 1994).

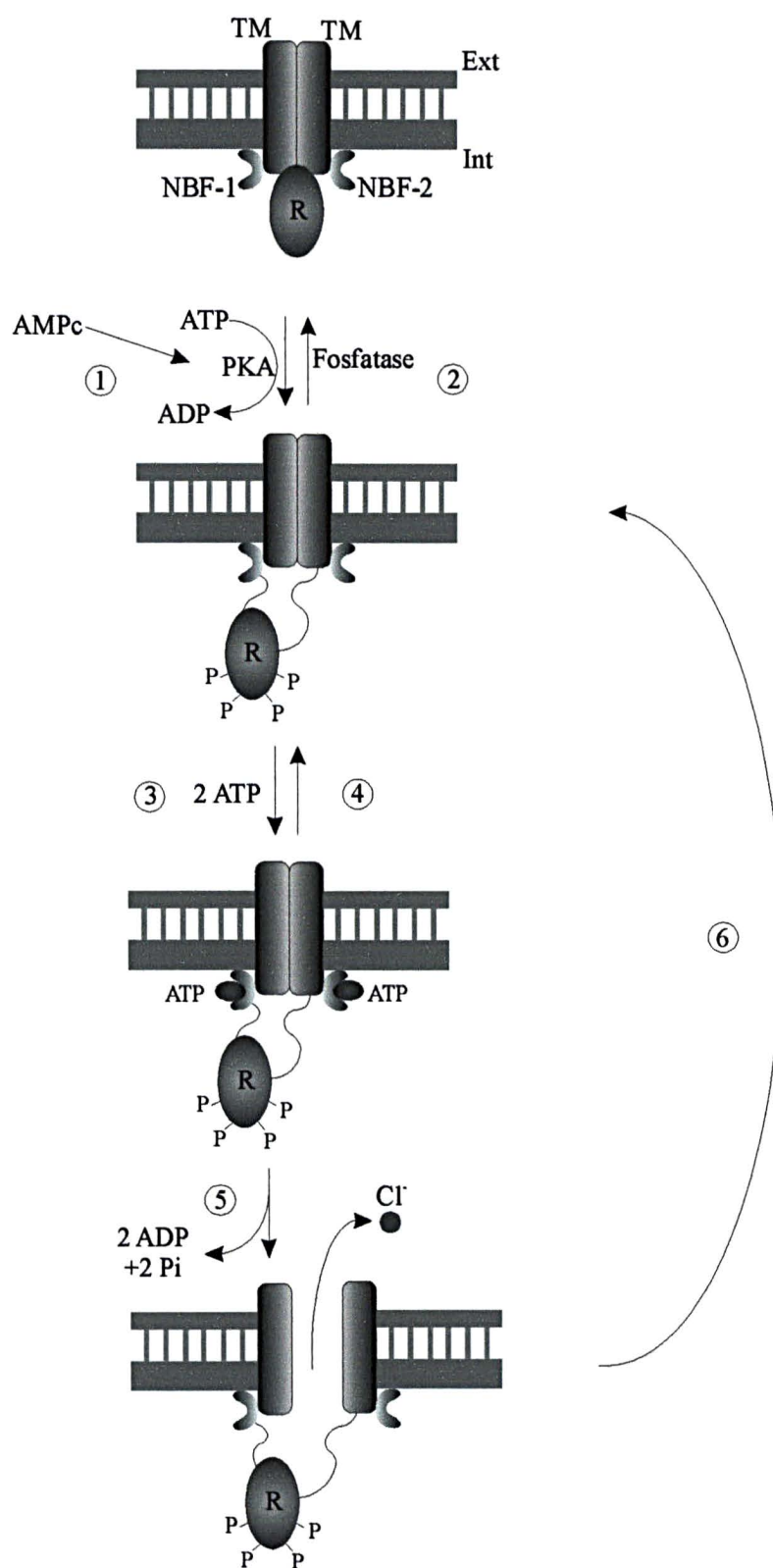
São necessários somente de 6 a 10% de proteína CFTR normal para que uma célula FC recupere um transporte de cloro similar ao de células com 100% de proteína CFTR normal. As uniões célula-célula parecem ser o mecanismo de amplificação dos efeitos das células corrigidas (JOHNSON e cols., 1992).

A proteína CFTR também pode ser responsável por outras funções como intervir nos processos celulares de endocitose e exocitose mediados por AMPc (BRADBURY e cols., 1992).

1.3.5.3 Regulação

Parte fundamental na regulação de CFTR é o domínio R. Foi demonstrado que quatro das serinas do domínio R (códon 660, 737, 795 e 813) são especificamente fosforiladas pela PKA na presença de AMPc (CHENG e cols., 1991), e que é necessário que ao menos uma delas esteja fosforilada para que o canal de cloro se ative (passo 1 na fig. 7). Este passo é reversível mediante a ação de uma ou mais fosfatases

FIGURA 7. MODELO DO FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA CFTR



FONTE: modificado de NILIUS e DROOGMANS, 2003.

que até o momento não foram identificadas (2). Além disso, foi observado que se o domínio R está deletado, o canal de cloro atua de forma constitutiva, independentemente da presença ou não de AMPc (RICH e cols., 1991).

A fosforilação do domínio R é necessária, porém não suficiente, para que haja transporte de cloro. Uma vez que o domínio R esteja fosforilado é preciso que o ATP se una a um dos dois NBF (3), o que provoca que estes alterem a sua conformação e permitam a abertura do canal (ANDERSON e cols., 1991b). O processo é reversível, dependendo do sentido da reação e da proporção intracelular entre ATP e ADP, mais do que a concentração absoluta de ATP (4). Entretanto, os dois NBF não são funcionalmente equivalentes: a hidrólise do ATP pela CFTR ocorre somente no NBF-2 (ANDERSON e cols., 1992). Depois da hidrólise do ATP e da passagem do cloro (5), os NBF recuperam sua conformação inicial e a CFTR volta a fechar-se.

Este modelo pressupõe que se o ATP se une à forma fosforilada de CFTR é produzida uma alteração conformacional que permite o fluxo passivo do cloro através da membrana celular de acordo com seu gradiente eletroquímico. Deste modo, CFTR seria um canal de cloro e não um transportador ativo, pois não existiria uma relação estequiométrica entre as moléculas de ATP hidrolizadas e o número de moléculas de cloro que passam através da membrana (COLLINS, 1992).

1.3.5.4 Amadurecimento

Uma vez que a proteína CFTR é sintetizada, sofre um processo de amadurecimento e glicosilação no Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi, alcançando, posteriormente, a membrana celular. Experimentos de localização da proteína CFTR, por imunofluorescência, demonstraram que se situa na parte apical da superfície de membrana de células epiteliais especializadas (KARTNER e cols., 1991; COHN e cols., 1992)

Algumas mutações afetam o processamento normal de amadurecimento da proteína, que permanece nas organelas intracelulares, aonde é degradada antes de chegar à membrana.

Desta forma, por exemplo, a mutação $\Delta F508$ produziria um fenótipo FC, não por afetar o funcionamento do canal de cloro, mas por desestabilizar a conformação da proteína (YANG e cols., 1993), que não poderia ser glicosilada corretamente (CHENG e cols., 1991). A proteína $\Delta F508$, parcialmente glicosilada e com uma conformação aberrante é reconhecida pelos mecanismos de controle intracelulares que a degradam, impedindo sua migração até a membrana (THOMAS e cols., 1992) (vide item 1.4.4). Entretanto, observou-se que a proteína $\Delta F508$ pode alcançar a membrana de determinados tipos celulares (DRUMM e cols., 1991; DALEMANS e cols., 1991; YANG e cols., 1993), se a temperatura durante o processo de maturação da proteína seja reduzida a 26°C (DENNING e cols., 1992a; 1992b). Uma vez que alcance a membrana, a proteína $\Delta F508$ apresenta uma atividade um pouco menor que a da proteína CFTR normal (LI e cols., 1993; YANG e cols., 1993).

1.4 Análise de Mutações no Gene CFTR

Até o momento já foram descritas mais de 1150 mutações diferentes no gene CFTR, e a cada ano mais de 50 novas mutações são descritas, sendo que conforme as técnicas de análise são aprimoradas, este número tende a aumentar (ZIELENSKI; TSUI, 1995; CFGAC, 2003).

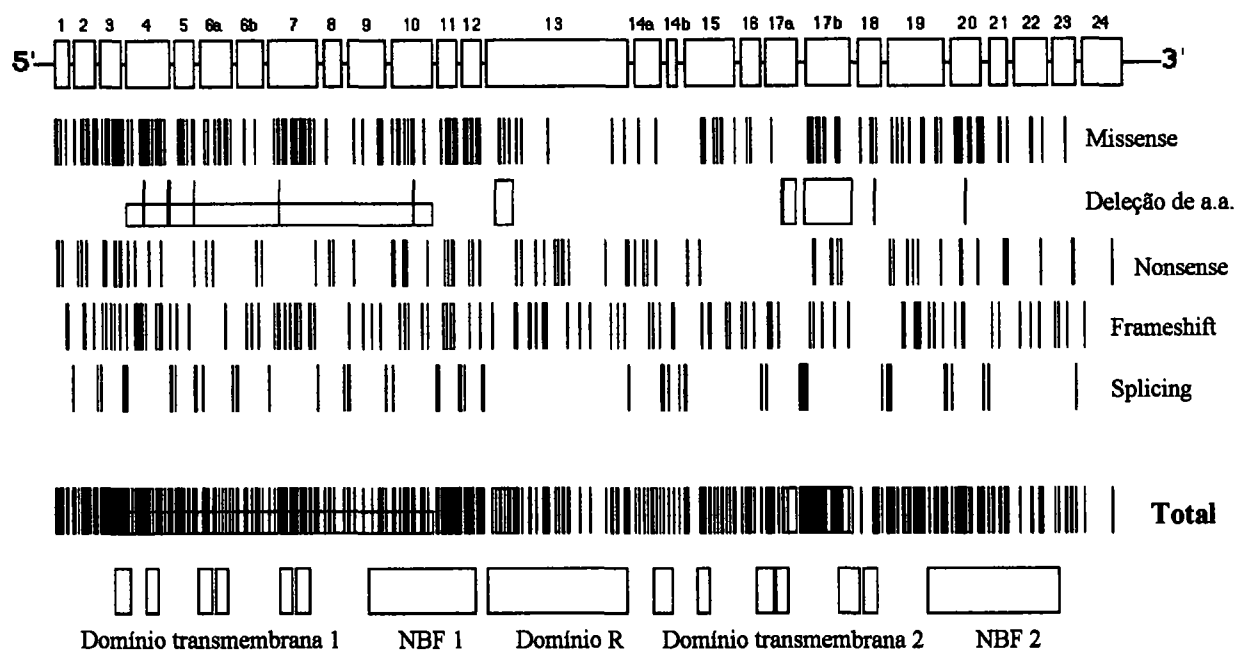
A análise de mais de 43.000 cromossomos FC de diferentes países e continentes tem mostrado que somente cinco mutações apresentam frequência mundial relativa maior que 1%. Estas mutações são $\Delta F508$ (66%), G542X (2,4%), G551D (1,6%), N1303K (1,3%) e W1282X (1,2%). Outras 19 mutações são encontradas com

freqüências que variam de 0,1 a 1% dos casos, mas sua distribuição apresenta variação geográfica, com a maioria destas mutações sendo restritas a áreas geográficas particulares. Finalmente há um grande número de mutações que são específicas a dadas regiões geográficas (CFGAC, 2003).

A mutação mais freqüente, $\Delta F508$ (presente em 66,8% dos cromossomos FC na Europa) (ESTIVILL e cols., 1997), se deve a uma deleção de três nucleotídeos no éxon 10, o que provoca a perda de uma fenilalanina no resíduo 508 da proteína CFTR (KEREM e cols., 1989).

As mutações associadas à FC não são aleatórias, e são mais comumente localizadas na primeira metade da proteína CFTR, principalmente na 1ª região NBF. A 1ª região MSD revela um aglomerado de mutações nos éxons 4 e 7. O maior número de mutações no gene CFTR se encontra na 1ª NBF, particularmente nos éxons 10 e 11. Poucas e raras mutações são encontradas na subunidade R e na 2ª região MSD. A 2ª região NBF, assim como a primeira, é sitio de diversas mutações, principalmente nos éxons 19 e 20. A maioria das mutações na região codificante da CFTR envolve transições do tipo G-A (24,1%) e C-T (14,7%), enquanto transversões G-T (11,9%) são o terceiro tipo mais comum. Existem 59 dinucleotídeos na região codificante, e em 26 destes ocorrem mutações. Entretanto apenas 15,7% das mutações na região codificante ocorrem em sítios CG, em contraste com publicações em outros genes humanos (COOPER; KRAWCZAK, 1993; MORRAL e cols., 1994). Cerca de 42% das mutações são modificações ou alterações do sentido, devido à substituição de amino-ácidos (“missense”), 23% do tipo que desvia ou altera o quadro de leitura (“frameshift”), 16% do tipo em que impede o correto processamento (corte e reunião) do RNA mensageiro (“splicing”), 15% do tipo em que ocorre a terminação da cadeia, (“nonsense”), e 4% são outros defeitos, incluindo deleções de aminoácidos e grandes deleções do DNA (fig. 8).

FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES FC, POLIMORFISMOS E TIPOS DE MUTAÇÃO EM CFTR



FONTE: modificado de ZIELENSKI e TSUI, 1995

NOTA: os sufixos "a" e "b" presentes na figura são designações históricas

a.a. = aminoácido

As linhas verticais indicam a localização de diferentes mutações CFTR (agrupadas em cinco categorias: missense, deleção de aminoácido, nonsense, frameshift e splicing), relacionadas aos éxons (no alto) e módulos da proteína codificada (em baixo).

Extensas análises haplotípicas utilizando marcadores extra e intragênicos demonstram que a maioria das mutações estão associadas com haplótipos únicos, indicando que estas mutações são derivadas de um evento mutacional único (MORRAL e cols., 1993a; 1996). Em algumas populações é possível identificar praticamente todas as mutações do gene CFTR presentes nos pacientes, porém, em outras populações isto não é possível; portanto, a identificação dos marcadores intragênicos tem sido um importante instrumento no aconselhamento genético. Já foram identificados polimorfismos intragênicos de repetições TA, CA, GT ou TTGA nos íntrons 1, 6a, 8 e 17b (MORRAL e cols., 1991; ZIELENSKI e cols., 1991a; MORRAL; ESTIVILL, 1992; MOULIN; SMITH; HARRIS, 1997).

Algumas mutações estão associadas com dois ou três haplótipos diferentes e, portanto, não podem ser derivadas uma da outra por mecanismos moleculares simples (DÖRK e cols., 1992; MORRAL e cols., 1994). Além disto, algumas destas mutações são detectadas em diferentes grupos étnicos, e, portanto, provavelmente representam mutações recorrentes que se originaram independentemente em cromossomos com diferentes haplótipos. Apenas três publicações descrevem mutações “*de novo*” no gene CFTR, todas paternas, uma ocorrendo em um dinucleotídeo CG alterando uma arginina na posição 851 por um códon de parada, outra trocando T para G (mutação L1065R), e a última uma alteração de A para G (mutação R1066H), demonstrando a taxa muito baixa de novas mutações no CFTR (WHITE e cols., 1991; CREMONESI e cols., 1996; CASALS e cols., 1998). Atualmente são conhecidas apenas seis grandes deleções no gene CFTR (MORRAL e cols., 1993b; MAGNANI e cols., 1996; CHEVALIER-PORST e cols., 1998; LERER e cols., 1999; DÖRK e cols., 2000; CHILLÓN, comunicação pessoal), porém suas frequências são menores de 0,01% do total de cromossomos FC.

1.4.1 Distribuição de Mutações na População Mundial

Desde a identificação do gene responsável pela fibrose cística em 1989, mais de 40.000 cromossomos da FC foram analisados em todo o mundo. Para se ter um melhor conhecimento das mutações descritas no gene CFTR, os dados foram analisados pelo *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* (CFGAC, composto por mais de 90 laboratórios em 30 países). A mutação mais freqüente nas distintas populações é $\Delta F508$, com uma freqüência média de 66%. Sua distribuição não é uniforme, sendo mais freqüente nas populações do norte da Europa e norte da América, onde tem uma freqüência de 70-80%, frente a 30-50% dos países mediterrâneos. De fato, existe um gradiente crescente sudeste-noroeste desde o mediterrâneo oriental (Israel 30%, Turquia 30%) até o norte da Europa (Dinamarca 88%) (EWGCFG, 1990; CFGAC, 1996).

A distribuição das outras mutações FC entre as distintas populações é muito heterogênea. Somente quatro mutações (G542X, G551D, W1282X e N1303K), têm uma frequência maior que 1%. Porém, e devido principalmente a deriva genética, cada população tem mutações específicas, presente em porcentagens maiores que 1-5% (ESTIVILL e cols., 1997).

O número das mutações caracterizadas em cada população é variável e depende diretamente do grau de heterogeneidade genética de cada população em particular, principalmente em função do isolamento da população (do intercâmbio genético com outras populações, de maneira que as características genéticas próprias se tenham diluído em um maior ou menor grau).

As populações mediterrâneas, por exemplo, são populações que apresentam um grau bastante alto de heterogeneidade genética (frente ao baixo grau apresentado pelas populações do norte da Europa), devido, principalmente, aos numerosos movimentos populacionais que têm sofrido ao longo da história.

Isto se pode observar na baixa porcentagem (75-80%) de cromossomos FC caracterizados nas populações do sul da Europa e no elevado número (30-50) de mutações encontradas (NUNES e cols., 1991; CHILLÓN e cols., 1994a; 1994b; ESTIVILL e cols., 1997), em relação ao baixo número (10-20) de mutações identificadas e a porcentagem elevada (90-99%) de cromossomos FC caracterizados, tanto em populações do norte da Europa (SUPER; SCHWARZ; MALONE, 1992; FÉREC e cols., 1992; CHADLE e cols., 1993; ESTIVILL e cols., 1997), como em populações americanas (ZIELENSKI; TSUI, 1995).

1.4.2 Distribuição de Mutações na População de Origem Africana

A fibrose cística é comum em populações de descendência européia, mas tem sido pouco descrita em populações de origem africana com pouca miscigenação. Entre a população ancestral miscigenada da África do Sul, ela ocorre na frequência de 1:12.000 nascidos vivos (HILL e cols., 1988). A incidência de FC em negróides norte

americanos foi estimada próxima a 1:14.500 (FITZSIMMONS, 1993; HAMOSH e cols., 1998), mas a incidência em indivíduos de origem africana sem miscigenação ainda é desconhecida. Desde 1954, casos esporádicos de FC têm sido descritos em afetados de origem africana (GROVÈ, 1959; MacDOUGALL, 1962; LEVIN e cols., 1967; SUPER, 1978; McCOLLEY e cols., 1991; PADOA e cols., 1999; MONNIER e cols., 2001) e existe a impressão de que a FC é sub-diagnosticada devido a alta prevalência de fatores que dificultam o diagnóstico, incluindo mal nutrição, infecções pulmonares crônicas, e, mais recentemente, tuberculose (CARLES e cols., 1996). Além disto, populações de origem africana carregam mutações FC não identificadas em populações de origem européia, o que torna este grupo uma importante ferramenta para uma melhor compreensão do gene CFTR (PHILLIPS e cols., 1995). Recentemente, MACEK e cols. (1997) reportaram a identificação de algumas mutações no gene que apresentam uma prevalência notável na população de afro-americanos, como a mutação 3120+1G:A, exclusiva de indivíduos de origem africana, com uma frequência de 12,2% no grupo analisado.

1.4.3 Distribuição de Mutações na População Brasileira

Apesar do Brasil possuir uma enorme população caucasóide e uma grande miscigenação aumentando teoricamente o número de casos na população não-caucasóide, a doença é muito pouco conhecida no país, inclusive pelos profissionais da área de saúde. Acredita-se que a incidência da doença na população brasileira seja baixa, baseado no número de casos diagnosticados por ano no país.

Vários fatores podem estar contribuindo para esta baixa taxa de diagnóstico, entre eles:

- uma baixa frequência gênica na população brasileira;
- altas taxas de mortalidade infantil cujas causas de morte "primária" seriam doenças pulmonares e gastrointestinais (sintomas mais frequentes da FC);
- óbito de grande parte dos afetados sem diagnóstico;
- dificuldade de acesso a testes diagnósticos;

- condições intrínsecas da doença como a variabilidade de expressão das formas clínicas.

A somatória destes fatores faz com que a média de idade ao diagnóstico no Brasil seja provavelmente alta se compararmos com a média de sete meses nos países mais desenvolvidos e que haja um intervalo de tempo provavelmente alto entre o aparecimento dos primeiros sintomas e a confirmação do diagnóstico, isto levando-se apenas em conta o grupo de pacientes nos quais o diagnóstico é feito. Se este período de latência entre o aparecimento de sintomas e o diagnóstico for prolongado, é possível que grande parte dos pacientes esteja indo a óbito, e outra parte deixe de receber qualquer conduta terapêutica ou esteja recebendo tratamentos inadequados, pois muitas vezes estas crianças podem ser diagnosticadas erroneamente como tendo doenças prevalentes em nosso país, do tipo Asma, Bronquite ou Tuberculose.

Talvez por consequência destes fatos, o grupo de crianças que chega ao diagnóstico no Brasil se apresenta ao médico já com quadro clínico bastante avançado, apresentando lesões pulmonares graves e desnutrição secundária importante, o que dificulta muito a terapêutica e piora sobremaneira o prognóstico e sobrevida. Os dados brasileiros existentes sobre a expectativa de vida dos pacientes demonstram que a sobrevida média do paciente brasileiro com FC está próxima aos nove anos de idade (9,65 anos – RASKIN, 2001), média esta semelhante à encontrada nos países desenvolvidos antes de 1960 (JONES, 1980; REGLAFQ, 1992; MACRI e cols., 1991).

Nos últimos anos foram desenvolvidos alguns estudos de genética molecular e epidemiológicos da FC em amostras da população brasileira. GAIDZINSKI (1992), em análise epidemiológica e social de famílias afetadas no Estado do Rio Grande do Sul, detectou que o impacto da FC na família dos afetados tem se expressado mais comumente sob forma de ansiedade, revolta, desconfiança, negação do problema, sentimentos de culpa, medo de uma nova gestação, crise de relacionamentos, estresse emocional e financeiro, queixas de isolamento social, atenção redobrada aos afetados e incerteza quanto ao futuro; avaliou que as mães dos pacientes têm o melhor grau de conhecimento sobre a doença entre os familiares; e identificou que na composição étnica de 96% das famílias afetadas estão ascendentes caucasianos.

RASKIN e cols. (1992a) realizaram estudos de marcadores do gene CFTR para aumentar a precisão de sua análise genética. Também desenvolveram metodologias para agilizar, facilitar e baratear os custos de análise molecular do gene CFTR através da análise direta sobre gotas de sangue em papel filtro (RASKIN e cols., 1992b; 1993; RASKIN, 2001). Além disto RASKIN e seu grupo realizaram grandes estudos relacionados a análise da frequência da mutação $\Delta F508$ em euro- e afro-brasileiros, análise das 5 mutações mais frequentes do gene CFTR em euro- e afro-brasileiros, análise das 70 mutações mais frequentes no gene CFTR em euro- e afro-brasileiros, além dos mais amplos trabalhos de triagem neonatal e análise epidemiológica realizados até o momento na população brasileira (RASKIN e cols., 1993; 1997a; 1997b; 1999; RASKIN, 2001).

MIRANDA e cols. (1993) utilizaram a PCR para determinar que a frequência alélica da mutação $\Delta F508$ da FC em 34 cromossomos de pacientes brasileiros, descendentes de latino-europeus, brasileiros nativos e negróides, é de 35%. MARTINS, RIBEIRO e COSTA (1993) determinaram que a frequência alélica da mutação $\Delta F508$ da FC, em uma amostra populacional de 24 pacientes do Estado de São Paulo, é de 33%. FERNANDES e cols. (1994) encontraram pelo menos uma mutação de FC em 9 dos 17 fibrocísticos de uma amostra hospitalar do Estado de Rio de Janeiro analisada, concluindo que a análise das mutações $\Delta F508$, G542X, N1303K, 1717-1G \rightarrow A, W1282X, G551D, R553X e $\Delta I507$ não é suficiente para detectar todas as mutações presentes.

FERRI (1995) estudou 240 cromossomos de indivíduos normais e afetados da população paulista, onde detectou as frequências das mutações $\Delta F508$ (38%), G542X (8,3%), N1303K (1,6%) e W1282X (0,8%) no gene CFTR. Em 1995 MARÓSTICA fez uma avaliação do fenótipo pulmonar de 61 pacientes de FC do Rio Grande do Sul, não encontrando relação do fenótipo pulmonar com os 3 grupos genéticos analisados ($\Delta F508/\Delta F508$, $\Delta F508$ /outra e outra/outra). LEWIS (1995) pesquisou a relação de 300 pacientes brasileiros com cólera e de 300 indivíduos controle (sem cólera), para as mutações $\Delta F508$ e G542X da FC. Como estas mutações não foram encontradas nos 600 indivíduos analisados, sugeriu-se novamente que a pressão seletiva em favor dos

heterozigotos, provavelmente, não foi em razão da bactéria que causa a cólera. Portanto, a hipótese de que a cólera tenha favorecido a elevação da frequência do gene CFTR na população caucasóide ainda necessita ser melhor avaliada.

DAMACENO (1996) pesquisou correlação do genótipo $\Delta F508$ e fenótipo pulmonar em 40 pacientes FC do Estado de São Paulo, não constatando a correlação, mas uma predisposição dos pacientes homozigotos e hererozigotos $\Delta F508$ a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. RIBAS (1996), pesquisando a relação entre genótipo e origem étnica em uma amostra de 76 pacientes do sul do Brasil, verificou quais são as mutações não- $\Delta F508$ mais frequentes entre os pacientes com origem étnica italiano/italiano (R1162X, 2183AA→G e N1303K), italiano/outro (G542X e N1303K) e outro/outro (R334W e G542X).

PARIZOTTO, BERTUZZO e RIBEIRO (1997) estudaram 120 pacientes com FC no Estado de São Paulo, alcançando uma taxa de detecção de 42,5%, analisando as mutações $\Delta F508$ (31,7%), G542X (8,3%), N1303K (2,5%), G551D (0%) e R553X (0%). Apesar destes estudos serem peças muito importantes, não tiveram como objetivo uma avaliação mais abrangente que proporcionasse uma visão mais ampla do quadro nacional nas diferentes etnias e estados brasileiros.

PEREIRA e cols., (1998) estudaram as mutações R1162X e 2183AA→G da FC em descendentes italianos do Estado do Paraná (com frequências respectivas de 15% e 7,5% que não diferem estatisticamente dos resultados encontrados na Itália) e em pacientes dos Estados do Paraná (com frequência de 1,02% para ambas mutações) e de Santa Catarina (10% e 3,33% respectivamente). Com estes resultados sugeriram a inclusão destas mutações no conjunto de mutações a serem analisadas nos pacientes FC nascidos nos Estados de Santa Catarina e Paraná.

BERNARDINO e cols. (2000) fizeram uma grande análise molecular no gene CFTR na população brasileira, encontrando algumas mutações novas. Em 2001 Cabello e colaboradores detectaram uma mutação que se apresenta com uma frequência bastante aumentada no Brasil, a 3120+1G:A, mutação esta frequente em populações afro-americanas (MACEK, e cols., 1997; CABELLO e cols., 2001).

1.4.4 Correlação Genótipo-Fenótipo

Uma forma de conhecer a função de CFTR é a análise dos genótipos dos pacientes e os fenótipos aos que estão associados. A mutação melhor estudada, por ser a mais freqüente e primeiramente descrita, é a $\Delta F508$, a qual está associada a clínica severa, insuficiência pancreática e um alto risco de íleo meconial, porém a associação não é absoluta. (KEREM e cols., 1990).

Para outras mutações menos freqüentes, os dados são difíceis de interpretar, já que o número de indivíduos FC homozigotos para estas mutações é baixo e as idades dos doentes não são homogêneas, o que implica que o estado clínico seja variável e as correlações não sejam fáceis de se estabelecer.

As primeiras observações de pacientes homozigotos para mutações de término de cadeia mostram um desenvolvimento moderado da doença (CUPPENS e cols., 1990). Isto podia ser devido ao fato de que a presença intracelular de uma proteína defeituosa é mais prejudicial para a célula que a ausência da proteína. Entretanto, estes resultados não se confirmaram em amostras mais amplas (SHOSANI e cols., 1992; ESTIVILL, comunicação pessoal).

Curiosamente, descreveu-se um paciente FC que apresenta duas mutações ($\Delta F508$ e R553Q) no mesmo cromossomo. Mesmo este paciente tendo sintomas pulmonares e insuficiência pancreática, a correlação de cloro no suor estava nos níveis normais (DÖRK e cols., 1991). Estudos com proteínas quimeras ST6-CFTR em leveduras, mostra os efeitos de outras mutações, que também podem diminuir o fenótipo severo da $\Delta F508$ ao suprimir parcialmente o defeito no transporte de cloro provocado pela $\Delta F508$ (TEEM e cols., 1993).

Dentre os distintos parâmetros clínicos da FC, a função pancreática é a que mostra uma melhor correlação com o genótipo dos pacientes. Todas as mutações de classe I e II causam insuficiência pancreática, enquanto que algumas de classe III e todas as de classe IV causam suficiência pancreática (TSUI e cols., 1992; WELSH; SMITH, 1993), sendo que as mutações de classe I e II agem como se fossem recessivas com relação às de classe III e IV (KOCH e cols., 2001; DURNO e cols.,

2002). Nas mutações de classe IV, o fluxo de cloro somente se encontra reduzido, com o que a atividade residual da proteína é suficiente para dar o fenótipo de suficiência pancreática. De fato, algumas mutações de classe IV (R117H) não provocam os sintomas clássicos da FC e somente causam infertilidade nos homens (ANGUIANO e cols., 1992).

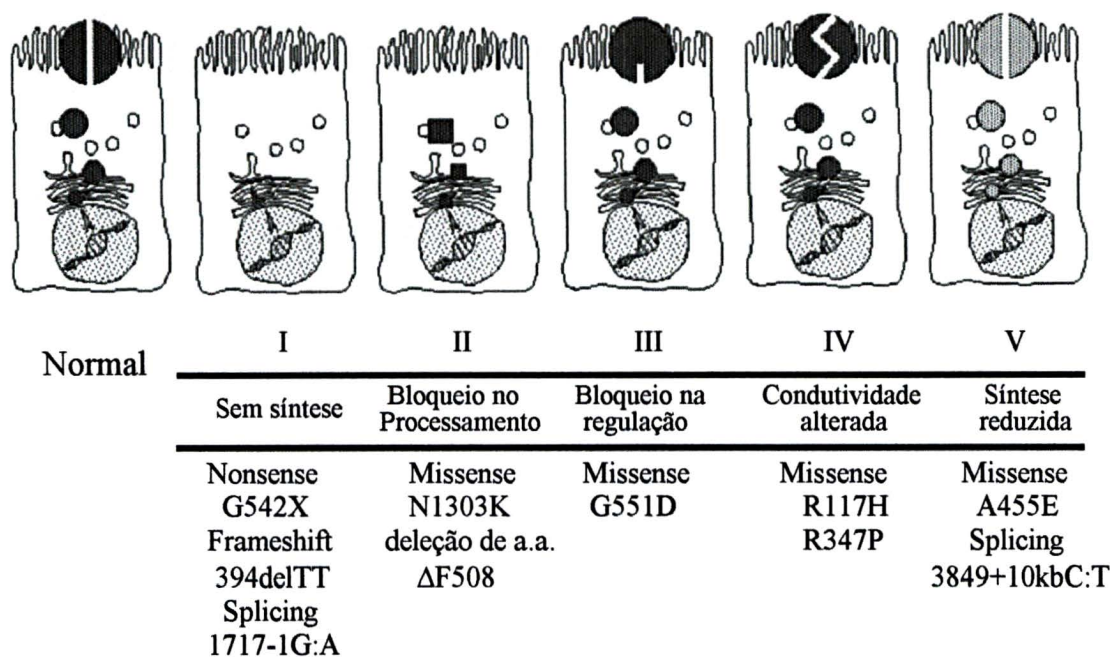
Recentemente, foram analisados dados de 800 afetados por FC de 32 países, com a finalidade de comparar as características clínicas das mutações mais frequentes. Assim, se comprovou que $\Delta F508$, G542X, R553X, N1303K, W1282X, 1717-1G \rightarrow A, 621+1G \rightarrow T 1811+1.6kbA:G estão associadas a insuficiência pancreática e fenótipo severo, enquanto que R117H está associada a suficiência pancreática e fenótipo leve (CFGPC, 1993; DURNO e cols., 2002; REBOUL e cols., 2002; KULCZYCKI; KOSTUCH; BELLANTI, 2003). Assim mesmo, se observou que, salvo para a função pancreática, não é possível fazer uma boa correlação genótipo-fenótipo para os outros parâmetros clínicos (função pulmonar, idade de diagnóstico, níveis de cloro no suor e percentuais de peso e altura), pondo em evidência que a influência de outros fatores (genéticos e ambientais) têm um importante papel no desenvolvimento da doença (TSUI e cols., 1992; CASTALDO e cols., 2001; KULCZYCKI; KOSTUCH; BELLANTI, 2003).

Desde 1996 alguns pesquisadores têm proposto a existência de genes modificadores modulando o fenótipo da fibrose cística (ROZMAHEL e cols., 1996). O fenótipo discordante observado em irmãos com FC argumenta contra um papel principal de fatores ambientais e sugere que outros genes, além do gene CFTR seriam os principais responsáveis por modular o fenótipo de FC (ACTON; WILMOTT, 2001; SALVATORE; SCUDIERO; CASTALDO, 2001). Existem, atualmente, vários genes sob estudo como potenciais modificadores da FC, particularmente os que influenciam na severidade da doença pulmonar, os que estão envolvidos no controle de infecções, imunidade e inflamação (ACTON; WILMOTT, 2001). Alguns destes incluem genes HLA de classe II [sobre os quais ARON e cols. (1999) encontraram que alelos DR7 estavam significativamente associados com um aumento na IgE total e com colonização crônica por *Pseudomonas aeruginosa*]; o gene HFE, responsável pela

hemocromatose humana (ROHLFS; SHAHEEN; SILVERMAN, 1998); o gene da alfa 1-antitripsina (AAT) [sobre os quais HENRY e cols. (2001) encontraram indicação de associação entre alelos AAT e melhores prognósticos pulmonares]; entre outros.

Uma outra tentativa de se tentar correlacionar a mutação com o fenótipo é através da análise do sítio de mutação na proteína, ou seja, verificar qual o tipo de mutação (código de parada, troca de um aminoácido, mudança no quadro de leitura, entre outros) e/ou em que domínio esta mutação ocorreu, para então prever se esta modificação está alterando a função, a síntese ou a estrutura secundária ou terciária da proteína. Neste sentido, foram propostos cinco mecanismos que podem levar a um prejuízo na função da proteína CFTR (ZIELENSKI; TSUI, 1995) (fig. 9) (fig. 10).

FIGURA 9. CONSEQÜÊNCIAS MOLECULARES DAS DIFERENTES CLASSES DE MUTAÇÕES DA FC

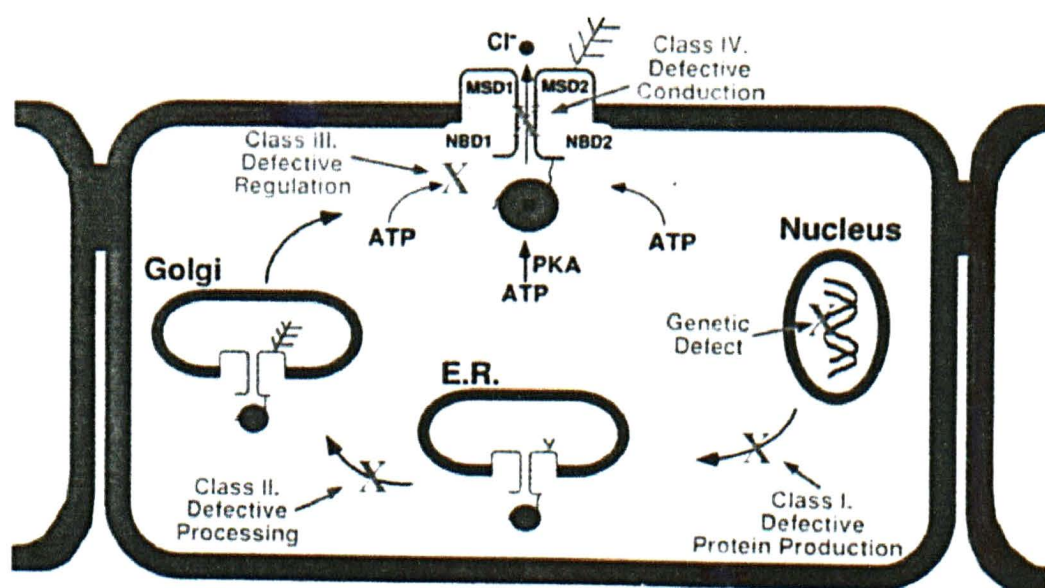


FONTE: modificado de ZIELENSKI; TSUI, 1995

Alterações da classe I resultam de mutações que levam a uma terminação prematura na tradução do gene CFTR, o que pode ser causado por: mutação em sítio de excisão anormais ou que causem mudança no quadro de leitura, ou ainda, mutações

sem sentido (TSUI, 1992). Mutações da classe II causam um defeito no processamento da proteína, onde a glicosilação é apenas parcial, provocando a degradação precoce desta proteína. Nesta classe encontramos a grande maioria das mutações da FC, incluindo a mais comum, a deleção $\Delta F508$ (WELSH; SMITH, 1993). As mutações da classe III não provocam problemas no processamento da proteína, porém, há um defeito na regulação do canal. Estas alterações ocorrem nos NBFs, causando uma diminuição na frequência de abertura do canal ou uma resposta anormal ao ATP (ANDERSON; WELSH, 1992). Na classe IV verificamos um defeito na condução, onde um número de mutações nos MSDs produzem canais corretamente localizados e com regulação normal, porém, devido a formação anormal do poro do canal, a quantidade de cloro que atravessa a membrana está diminuída, geralmente em 1/3 da capacidade normal. Finalmente na classe V encontramos as mutações que causam uma diminuição na quantidade de RNAm funcional (WELSH; SMITH, 1993; ZIELENSKI; TSUI, 1995) (fig. 9) (fig. 10).

FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS QUATRO CLASSES DE ANORMALIDADES NO PROCESSAMENTO DA CFTR GERADAS POR MUTAÇÕES EM CFTR



FONTE: WELSH e SHMIDT, 1993

Alguns pesquisadores têm tentado fazer uma correlação entre o tipo de mecanismo mutacional e o fenótipo. Contudo, como já mencionado, a grande variabilidade clínica encontrada entre os pacientes, especialmente a pulmonar, e a existência de heterozigotos compostos dificulta o estabelecimento desta correlação. Mesmo com estes problemas, de acordo com o defeito, espera-se que indivíduos da classe I e II tenham um quadro clínico grave, visto que há uma perda na localização celular correta da proteína. Assim sendo, mutações destas classes têm sido associadas com o fenótipo de insuficiência pancreática grave, como por exemplo a $\Delta F508$, a G542X e a 1811+1.6kbA:G (WELSH; SMITH, 1993; ZIELENSKI; TSUI, 1995; REBOUL e cols., 2002). Em contraste, os da classe III e IV têm a proteína corretamente localizada, resultando em uma função residual ou anormal desta proteína (WELSH; SMITH, 1993; ZIELENSKI; TSUI, 1995). Na classe III encontramos indivíduos com suficiência (G551S) e insuficiência (G551D) pancreática, podendo sugerir que há um grau de regulação anormal dependendo da alteração molecular (CUTTING e cols., 1990; STRONG e cols., 1991). Os indivíduos pertencentes à classe IV apresentam uma atividade residual do canal de cloro capaz de conferi-los um fenótipo de suficiência pancreática. Nesta classe, alguns indivíduos (R117H) assumem manifestações atípicas da FC, como apenas CBAVD (ANGUIANO e cols., 1992). Alterações de classe V incluem mutações na região promotora que reduzem a transcrição, alterações em nucleotídeos promovendo splicing alternativos do transcrito CFTR, e substituições em aminoácidos que causam maturação ineficiente da proteína. Todas as mutações de classe V reduziram a quantidade de proteína funcional expressa, pois, desde que uma pequena quantidade de RNAm é presumidamente produzida a partir destes alelos mutantes, apesar da grande quantidade de RNAm aberrante, um pequeno efeito funcional é esperado (ZIELENSKI; TSUI, 1995).

Mesmo sabendo-se que a FC é uma doença autossômica recessiva, verificamos que quando um indivíduo possui um alelo para insuficiência pancreática e o outro para suficiência, o fenótipo é de suficiência pancreática. Desta forma, uma mutação “dominante” estaria conferindo a atividade parcial do canal de cloro,

permitindo um fenótipo mais benigno (WELSH; SMITH, 1993; KULCZYCKI; KOSTUCH; BELLANTI, 2003) (tab. 4).

TABELA 4. CLASSES DE MUTAÇÕES EM CFTR

CLASSE	DEFEITO	EXEMPLOS	DOMÍNIO	FREQUÊNCIA (%)	CLÍNICA
I	Produção da proteína: - sem sentido - muda o quadro de leitura - excisão	G542X	NBF1	3,4	PI
		390insT	NBF2	2,1	PI
		621+G:T	MSD1	1,3	PI
II	Processamento	ΔI507	NBF1	0,5	PI
		ΔF508	NBF1	70	PI
		S549R	NBF1	0,3	PI
		A559T	NBF1	-	-
		N1303K	NBF2	1,8	PI
III	Regulação	G551D	NBF1	2,4	PI
		G551S	NBF1	rara	PS
		G1244E	NBF2	rara	PI
		S1255P	NBF2	rara	PI
		G1349D	NBF2	rara	PI
IV	Condução	R117H	MSD1	0,8	PS
		R334W	MSD1	0,4	PS
		R347P	MSD1	0,5	PS

FONTE: WELSH; SMITH, 1993

NOTAS:PI = insuficiência pancreática

PS = suficiência pancreática

1.5 Terapia Gênica e Fibrose Cística

Mesmo sendo a fibrose cística uma doença multissistêmica, a principal causa de morte é o deterioramento progressivo da função pulmonar como consequência das infecções e da acumulação crônica de secreções nas vias respiratórias. Assim, a correção do defeito genético sobre o trato respiratório constitui um objetivo prioritário.

Atualmente se utilizam duas estratégias especialmente prometedoras na terapia da FC. A mais direta é a expressão do gene normal ou a inserção da proteína normal nas células afetadas (EGAN e cols., 1992). Esta estratégia tem a vantagem de poder recuperar, independentemente da classe de mutação, todas as funções de CFTR. Uma

segunda estratégia consiste em estimular outros canais de cloro na membrana apical dos epitélios afetados.

Em dezembro de 1992 foi aprovada nos Estados Unidos a aplicação de terapia gênica em afetados por fibrose cística pelo *National Institutes of Health Recombinant Advisory Committee*. Os experimentos devem ser realizados com o total consentimento dos pacientes. Em cada caso, vetores são aplicados a regiões restringidas do nariz e do epitélio bronquial, seguindo-se intensivamente seus efeitos moleculares e eletrofisiológicos. Os pacientes são monitorizados para avaliar qualquer reação imunológica ou uma distribuição anormal do vetor. O principal benefício destes experimentos será conseguir informações sobre a eficácia, segurança e respostas a distintas doses deste sistema (COUTELLE e cols., 1995).

O defeito fisiológico em células FC pode ser corrigido através da introdução de uma única cópia normal do gene CFTR. De fato, somente é necessário conseguir de 4 a 6% da expressão de CFTR no epitélio respiratório para que o defeito básico se corrija (RAMALHO e cols., 2002).

A transferência direta de DNA recombinante é ineficaz, portanto os genes devem ser introduzidos nas células epiteliais de vias respiratórias mediante vetores virais ou métodos químicos. A utilização de vetores retrovirais é uma metodologia bastante atrativa para a terapia gênica em FC, principalmente devido a sua habilidade de se integrar no genoma da célula hospedeira, o que pode levar a uma expressão duradoura e, talvez, a cura. Entretanto a utilização de retrovírus para transferência gênica para o epitélio respiratório tem estado limitada pelos baixos títulos obtidos e pela necessidade de proliferação celular (JOHNSON, 2001)

Os adenovírus são atualmente mais utilizados, já que não necessitam da divisão da célula hospede para a expressão e apresentam tropismo para as células pulmonares. Entretanto, ao não se integrar no genoma celular é necessário realizar repetidas infecções. Atualmente, testes clínicos com aerosol em pacientes FC têm sido conduzidos por cinco diferentes grupos, três deles usando vetores de adenovirus e dois usando lipossomos catiônicos carregando a seqüência codificadora para a proteína CFTR. O desenvolvimento desta pesquisa tem demonstrado que a transferência gênica

do lúmen para o epitélio respiratório já pode ser realizada *in vivo*, mas ainda com baixa eficiência e por um período limitado, não atingindo ainda benefícios clínicos (O'DEA; HARRISON, 2002; GRIESENBACH; ALTON, 2001; GRIESENBACH e cols., 2002).

Nos primeiros experimentos com adenovírus se conseguiu inserir DNAC-FTR humano em células epiteliais do trato respiratório de rato, obtendo a correção do transporte de cloro durante seis semanas (ROSENFELD e cols., 1992). Posteriormente, foram realizados experimentos de transfecção com adenovírus em modelos xenógrafos (de epitélio bronquial humano) observando-se a expressão estável de níveis elevados de proteína CFTR humana (ENGELHARDT e cols., 1993). Algum tempo atrás se conseguiu, mediante a transfecção com adenovírus, corrigir temporariamente o defeito no transporte de cloro no epitélio nasal de afetados por fibrose cística (ZABNER e cols., 1995a); assim como demonstrar que a transfecção repetida de DNAC-FTR no epitélio do trato respiratório de primatas é eficaz e clinicamente segura (ZABNER e cols., 1995b).

Os cromossomos artificiais de mamíferos (MAC) tem como principais vantagens a capacidade de segregação em células de mamíferos (por terem telômeros e centrômeros), uma expressão fisiologicamente controlada, a integração de fragmentos de DNA de grande tamanho (várias centenas de kilobases) e a não integração no genoma da célula hospedeira (HUXLEY, 1994). Entretanto, os conhecimentos sobre a replicação e segregação dos cromossomos em células de mamíferos não são, ainda, suficientes para a construção de MACs, devido ao fato de que esta tecnologia está no início de seu desenvolvimento.

Apesar do gene ter sido clonado há mais de 13 anos, ainda não se obteve um método seguro e eficiente para terapia gênica em fibrose cística. Para isto, ainda existe a necessidade de um melhor conhecimento da relação entre genótipo e fenótipo e de um conhecimento mais aprofundado de como é e qual é a ação dos genes moduladores nos fenótipos FC. Com um maior avanço neste sentido, metodologias mais eficientes de terapia poderão ser obtidas.

2 Material e Métodos

2.1 Famílias Estudadas

Foram estudados os cromossomos de 79 indivíduos brasileiros afetados pela doença fibrose cística bem como os cromossomos dos pais destes indivíduos a fim de identificar as fases dos haplótipos dos seis marcadores genéticos analisados, que possibilitaram as análises de ligação entre os marcadores e as mutações e investigação da origem étnica da mutação. Também foram estudados cromossomos normais de indivíduos da população brasileira a fim de se identificar quais são os haplótipos de FC presentes na população geral, bem como suas frequências. Para isto, foi realizado o estudo de famílias a fim de se identificar os haplótipos existentes.

O material biológico estudado foi o DNA destes indivíduos. As famílias foram obtidas por contato com as associações estaduais de Fibrose Cística e por contato direto com médicos dos estados do PR, SC e MG. O termo de anuência (apêndice 1), as fichas com os dados clínicos (apêndice 2) e étnicos (apêndice 3), foram levantados diretamente com as famílias ou através dos médicos responsáveis.

Dados fenotípicos clássicos, como a pigmentação do abdômen, a cor e o tipo de cabelo e a conformação do nariz e dos lábios, foram utilizados para a caracterização dos indivíduos afro-brasileiros (KRIEGER e cols., 1965; AZEVÊDO, 1980; AZEVÊDO e cols., 1982). Foram também tomados cuidados como questionamentos sobre parentes com suspeita e/ou diagnóstico da doença, e análise de sobrenomes, para incluir apenas indivíduos não aparentados.

2.1.1 Indivíduos Normais

2.1.1.1 Heterozigotos Euro-Brasileiros

Como euro-brasileiros foram incluídos todos os indivíduos que apresentaram coloração clara da pele e descendência européia. Foram incluídos como heterozigotos euro-brasileiros todos os pais de pacientes euro-brasileiros, estes últimos com diagnóstico clínico-laboratorial de FC nascidos nos Estados do PR e SC, sendo que no PR foram analisados 60 genitores e em SC 45. O cromossomo selvagem dos pais dos pacientes foi utilizado como cromossomo "normal" para estudo dos marcadores internos do gene CFTR, sendo denominados de "cromossomo normal".

2.1.1.2 Heterozigotos Afro-Brasileiros

Como afro-brasileiros foram incluídos todos os indivíduos que apresentaram coloração escura da pele e provável descendência africana. Foram incluídos como heterozigotos afro-brasileiros todos os pais afro-brasileiros de pacientes afro-brasileiros, estes com diagnóstico clínico-laboratorial de FC do Estado de MG, totalizando 30 amostras. O cromossomo selvagem dos pais dos pacientes afro-brasileiros foi utilizado como cromossomo "normal" para estudo dos marcadores internos do gene CFTR na população afro-brasileira, sendo denominados de "cromossomo normal".

2.1.2 Pacientes

2.1.2.1 Pacientes Euro-Brasileiros

A amostra foi composta por 56 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado de FC, em acompanhamento ou diagnosticados durante o período de estudo. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes nascidos no PR (33) e SC (23).

Foram selecionados todos os indivíduos que tinham história pregressa de pneumopatia de repetição e/ou quadro de insuficiência pancreática, caracterizada por presença de gordura nas fezes determinado por pelo menos dois exames Sudam III positivos. E duas dosagens de cloro no suor com valores maiores ou igual a 60 mEq/l, medidos pela técnica de Gibson (iontoforese pela pilocarpina) (GIBSON; COOK, 1959).

Nos casos em que mais de um membro da família era afetado, foi incluído sempre o paciente mais velho, e apenas um indivíduo por família.

Os cromossomos dos indivíduos afetados, e que, portanto apresentaram mutação, foram denominados de “cromossomos mutados”.

2.1.2.2 Pacientes Afro-Brasileiros

Foram analisadas 23 amostras de pacientes afro-brasileiros nascidos com FC no Estado de MG, selecionados pelos mesmos critérios descrito para o grupo de pacientes euro-brasileiro.

2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue total de acordo com a metodologia descrita por JOHN e cols. (1990) e modificada por LAHIRI e NURNBERGER JR (1991). A técnica descrita abaixo se baseia nas seguintes etapas para a obtenção de DNA: lise das hemáceas; lise dos núcleos dos linfócitos; retirada das proteínas através da precipitação destas; precipitação do DNA; lavagem do DNA e diluição em tampão TE (0,5 ml de Tris 1 M, 0,5 ml de EDTA 0,1 M e completar com água bidestilada até 50 ml).

Em um tubo falcon de 15 ml (Becton Dick.) colocou-se o creme leucocitário proveniente de 5ml de sangue e completou-se para 10ml de volume com solução TKM1 (descrito abaixo) e 125 µl do detergente Nonidet P-40 (Sigma). Inverteu-se lentamente o tubo, várias vezes, para misturar bem o detergente, e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, virando o tubo lentamente deixando o "pellet"; completou-se novamente o tubo para 10 ml de volume com solução TKM1, ressuspendeu-se o "pellet" com pipeta pasteur (Fisher) e centrifugou-se o tubo a 4000 rpm por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se delicadamente o "pellet" com micropipeta (Gilson), adicionando 800 µl de solução TKM2 (descrito abaixo), passou-se tudo para um tubo eppendorf de 1,5 ml (Nalgene) e adicionou-se 50 µl de SDS (Merck) a 10%. Este material ficou encubado em banho-maria (Fanen 100) a 55°C por 20 minutos. Tirou-se do banho-maria, adicionou-se 300 µl de NaCl (Merck) saturado (6M) e centrifugou-se o tubo a 12.000 rpm por 10 minutos (microcentrífuga Fanen 212). Virou-se o sobrenadante para um tubo de ensaio (sobrenadante contendo o DNA, precipitado contendo as proteínas) e adicionou-se 2 volumes de etanol (Merck) 100% gelado. O tubo de ensaio, então, foi invertido várias vezes, até o DNA precipitar. O DNA foi "pescado" com ponteira de micropipeta com a ponta cortada, lavado com etanol 70% e transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml, o qual ficou na estufa à 37°C (Fanen 315) até o restante do etanol evaporar.

Ressuspendeu-se o DNA em aproximadamente 200µl de tampão TE e este ficou no banho-maria a 55°C, por 45 minutos, e depois na geladeira por 3 dias.

QUADRO 1 - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

TKM1		
Tris-HCl pH 7.6	1,0M	5,0 ml
KCl (Merck)	1,0M	5,0 ml
MgCl ₂ (Merck)	1,0M	5,0 ml
EDTA (Merck)	0,1M	10,0 ml
H ₂ O bidestilada até completar o volume de 500 ml		
TKM2		
Tris HCl pH 7.6	1,0M	0,5 ml
KCl	1,0M	0,5 ml
MgCl ₂	1,0M	0,5 ml
EDTA	0,1M	1,0 ml
NaCl	1,0M	20,0 ml
H ₂ O bidestilada até completar o volume de 50ml		

2.3 Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR)

A PCR se baseia na amplificação seletiva *in vitro* de regiões específicas de DNA (SAIKI e cols., 1988) e consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita, hibridação (anelamento) com oligonucleotídeos e extensão da cadeia de DNA mediante a ação da *Taq* polimerase. Esta técnica apresenta vantagens consideráveis frente a outros métodos de análise molecular: necessita pequena quantidade de amostra, realiza-se em poucas horas e, de maneira geral, não necessita da utilização de isótopos radioativos.

2.3.1 Protocolo

A PCR permite a amplificação de fragmentos desde aproximadamente 50 pb até mais de 3.000 pb e, para cada fragmento de DNA que se quer amplificar, deve-se

TABELA 5. CONDIÇÕES DE PCR E OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DOS 27 ÉXONS DO GENE CFTR E SUAS SEQUÊNCIAS INTRÔNICAS FLANQUEANTES

continua

ÉXON	OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS	CONDIÇÃO DE PCR
1	I1D9: GCACCCAGAGTAGTAGGTCT I1-3: ACACCGCCCTCCTCTTTCGTG	A
2	2i-5: CCAAATCTGTATGGAGACCA 2i-3: TATGTTGCCCAGGCTGGTAT	A
3	3i-5: CTTTGGGTTAATCTCCTTGGA 3i-3: ATTCACCAGATTTCGTAGTC	A
4	I4D1: CTTGTGTTGAAATTCTCAGGG I4R1: CAGCTCACTACCTAATTTATGA	A
5	I5D1: GAGAAGATAGTAAGCTAGAT I5R1: TATTAACAACAGGCTAAGGT	B
6a	6ai-5: TTAGTGTGCTCAGAACCACG 6ai-3: TGAATGAGTCTGTACAGCG	A
6b	I6bD1: AATAATGCCCATCTGTTGAATAA 6bi-3: GAGGTGGAAGTCTACCATGA	A
7	I7D1: ACACTGGTACTTTCATTGT I7R1: AGAGAAATGCTAGGAAAAG	B
8	I8D1: AATTCATATATAAGATGTAGCAC I8R1: GAGTGATCCTCCTCCAGT	A
9	9i-5: TAATGGATCCATGGGCCATGT 9i-3: ACCAGTGTTGAATGTGGTGCA	A
10	10i-5: GCAGAGTACCTGAAACAGGA 10i-3: CATTACAGTAGCTTACCCA	A
11	I11D1: TTCAGCAATGTTGTTTTTGACCAAC I11R1: TTACAGCAAATGCTTGCTAGACCA	A
12	12i-5: GTGAATCGATGTGGTGACCA 12i-3: CTGGTTTAGCATGAGGCGGT	A
13	13i-5: TGCTAAAATACGAGACATATTGCA 13aR1: CAGAATCTGGTACTAAGGACAG 13bD1: CTCAATCCAATCAACTCTATACGAA 13i-3: TACACCTTATTCCTAATCCTATGAT	A
14a	I14aD1: ACACTTAGATTCAAGTAATACTAT 14ai-3: AAAAGGTATGCCACTGTAAAG	B
14b	I14bD1: CATCAAATGGTGTGATGTGAA I14bR1: TACATACAAACATAGTGGATTAC	A
15	15i-5: GTGCATGCTCTTCTAATGCA 15i-3: AAGGCACATGCCTCTGTGCA	A

		conclusão
Éxon	Oligonucleotídeos usados	Condição de PCR
16	I16D1: AATGCGTCTACTGTGATC I16R1: CGAATAGACAGGACTTCAA	B
17a	17ai-5: CAATGTGCACATGTACCCTAA I17aR1: GAATCTCAAATAGCTCTTATAGC	A
17b	17bi-5: TTCAAAGAATGGCACCAGTGT 17bi-3: ATAACCTATGAAATGCAGCA	A
18	18i-5: GTAGATGCTGTGATGAACTG 18i-3: AGTGGCTATCTATGAGAAGG	A
19	I19D2: ATTCCTGTAGTTCATTGAAAA I19R2: GTTCAGACTCTGCAAATTTAA	A
20	20i-5: GGTCAGGATTGAAAGTGTGCA 20i-3: CTATGAGAAAAGTGCCTGGA	A
21	21i-5: AATGTTTACAAGGGACTCCA 21i-3: CAAAAGTACCTGTTGCTCCA	A
22	I22D2: CATAAGCTTTCAGAACTCCTG 22i-3: TGTCACCTAGAAGCAGGCAT	A
23	I23D1: GAACAATAGACATATTATCAAGG I23R1: GTGAGATTGTTATCAAGAATTAC	A
24	24i-5: GGACACAGCAGTAAATGTTG I24R1: AGGTAAGTGTCCACGAGCT	A

FONTE: ZIELENSKI e cols., 1991b

2.3.3 PCR Sítio-Dirigida

É uma modificação da PCR (HALIASSOS e cols., 1989). Nesta metodologia é introduzida uma alteração na seqüência do fragmento amplificado ao ser utilizado um oligonucleotídeo que tem uma base não correspondente a seqüência com a qual deve se unir. Este tipo de PCR é utilizado quando se quer criar um sítio de restrição para uma endonuclease com a finalidade de se poder facilitar a análise de um polimorfismo ou de uma mutação.

No desenho do oligonucleotídeo deve-se levar em conta que o único nucleotídeo que não pode ser alterado é o da extremidade 3'. Também deve-se

observar que a mutação ou o polimorfismo a ser analisado não deve estar incluído na seqüência do oligonucleotídeo.

As condições de amplificação são iguais as da PCR normal. Este tipo de PCR foi utilizado na análise das mutações: V232D (utilizou-se a enzima *Hinf* I) e 711+5G:A (utilizou-se a enzima *Bsa* I)

2.3.4 PCR interna ou *nested*-PCR

É uma outra modificação da PCR. É utilizada para se obter uma maior especificidade. A *nested*-PCR é a realização de uma segunda PCR partindo-se de uma PCR anterior, utilizando-se, pelo menos, um nucleotídeo interno. Este tipo de PCR foi utilizado na análise do marcador IVSt6-9(n), já que apresenta uma elevada homologia de seqüência com pelo menos 40-50 regiões do DNA (ESTIVILL, comunicação pessoal).

As condições são as mesmas da PCR normal, utilizando-se 1-2µl do produto da PCR prévia.

2.4 Análise dos Marcadores

O marcador IVS6aGATT foi analisado através de uma reação de PCR contendo 200 ng de DNA genômico; 400 µM de dNTP; 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores 6ai-5 e 6ai-3 (tab. 6); 50 mM de KCl; 10 mM de Tris -HCl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂ e 2 U de *Taq* DNA polimerase em um volume total de 25 µl. As condições são as mesmas da PCR normal, utilizando-se as temperaturas de 50°C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 50 segundos e 72°C para extensão da cadeia por 1 minuto e 30 segundos. Após a amplificação, 20 µl do produto de PCR foram misturados à uma solução contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 40% (p/v) de sacarose em água (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS,

1989) e foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de acrilamida a 12%, sendo submetido a uma voltagem de 200 V por um período de aproximadamente 23 horas. Depois de realizada a corrida o gel foi corado com uma solução de 0,01% de brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml. O tamanho dos alelos foi determinado através de comparação com controles de indivíduos que já apresentam os seus alelos caracterizados e que correram junto com as amostras.

Os microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA foram analisados em uma reação de PCR múltipla baseada na técnica descrita por Morral e Estivill (MORRAL; ESTIVILL, 1992). Duzentos nanogramas de DNA genômico foram amplificados através da técnica de PCR com 400 μ M de cada dNTP; 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores AC8R4, AT17R1.2 e AC17R2; 1,5 pmol do iniciador AC8D3, 3 pmol do iniciador AT17D1.2 e 0,5 pmol do iniciador AC17D2.2 (tab. 6); 50 mM de KCl; 10 mM de Tris -HCl, pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$ e 2 U de *Taq* DNA polimerase em um volume total de 25 μ l. As condições são as mesmas da PCR normal, utilizando-se as temperaturas de 50 °C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 40 segundos e 74 °C para extensão da cadeia por 50 segundos. Parte do produto da reação foi misturado com uma solução de formamida, aplicado em um gel de acrilamida a 6% com uréia e submetido a uma voltagem de 1500 V por um período de aproximadamente 3 horas e meia. Depois de realizada a corrida o gel foi corado com prata como posteriormente será descrito. O tamanho dos alelos foi determinado através de comparação com controles de indivíduos que já apresentam os seus alelos caracterizados e que correram junto com as amostras.

O marcador IVS8-T(n) foi analisado através de uma reação de *nested*-PCR, com a primeira PCR contendo 200 ng de DNA genômico; 400 μ M de dNTP; 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores I9D9n e E9R2 (tab. 6); 50 mM de KCl; 10 mM de Tris -HCl, pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$ e 2 U de *Taq* DNA polimerase em um volume total de 25 μ l e nas condições normais de PCR, com as temperaturas de 48°C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 50 segundos e 72°C para extensão da cadeia por 1 minuto. Para a segunda PCR foi utilizado de 1-2 μ l de produto de PCR previamente amplificado; 400 μ M de dNTP; 10 pmol dos oligonucleotídeos

iniciadores I9D9n e 9i-3 (tab. 6); 50 mM de KCl; 10 mM de Tris -HCl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂ e 2 U de *Taq* DNA polimerase em um volume total de 25 µl e nas condições normais de PCR, com as temperaturas de 50°C para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 30 segundos e 72°C para extensão da cadeia por 40 segundos. Para a visualização dos fragmentos foi utilizado um procedimento idêntico ao do marcador IVS6aGATT.

O marcador dialélico T854/*Ava* II foi amplificado através da técnica de PCR obedecendo as mesmas condições anteriormente descritas para o microsatélite IVS6aGATT sendo que os oligonucleotídeos iniciadores são: 14ai3 e 14aD1 (tab. 6). O fragmento de DNA amplificado foi digerido com 6 U da enzima *Ava* II (37 °C por 12 horas). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) e corados com uma solução de 0,01% de brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml.

TABELA 6. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA OS SEIS MARCADORES GENÉTICOS ANALISADOS

NOME	SEQÜÊNCIA
AC8R4	5' - ACTAAGATATTTGCCCATATCAAGT - 3'
AT17R1.2	5' - GACAATCTGTGTGCATCG 3'
AC17R2	5' - AAAGTTACCGACAAGAGGA - 3'
AC8D3	5' - TCTATCTCATGTTAATGCT - 3'
AT17D1.2	5' - GCTGCATTCTATAGGTTATC - 3'
AC17D2.2	5' - TGTCACCTCTTCATACTCAT - 3'
6ai-5	5' - TTAGTGTGCTCAGAACCACG - 3'
6ai-3	5' - TGGAATGAGTCTGTACAGCG - 3'
14aD1	5' - ACACTTAGATTCAAGTAATACTAT - 3'
14ai3	5' - AAAAGGTATGCCACTGTTAAG - 3'
I9D9n	5' - GAGAAGATAGTAAGCTAGAT - 3'
E9R2	5' - TATTAACAACAGGCTAAGGT - 3'
9i-3	5' - ACCAGTGTTGAATGTGGTGCA - 3'

FONTE: CHILLÓN, 1994

2.4.1 Coloração com Nitrato de Prata

A coloração com prata foi baseada na técnica descrita por Sammons (SAMMONS e cols., 1981) e seguiu-se o seguinte protocolo:

- Colocou-se o gel em um recipiente e lavou-se rapidamente com dH_2O ;
- Retirou-se a dH_2O e adicionou-se uma solução de HNO_3 a 1% (solução estoque a 65%) até que se cobrisse o gel por um período de 3 min e em agitação lenta;
- Retirou-se a solução de HNO_3 e fez-se duas lavagens de 15 seg com dH_2O ;
- Retirou-se a dH_2O e adicionou-se uma solução de AgNO_3 a 0,2% até que se cobrisse o gel por um período de 20 min em agitação lenta;
- Retirou-se a solução de AgNO_3 e fez-se duas lavagens de 5 seg com dH_2O ;
- Retirou-se a dH_2O e adicionou-se uma solução de 2,96% de Na_2CO_3 e 0,054% de formaldeído até que se cobrisse o gel e agitou-se lentamente até que a solução escurecesse (aproximadamente 1 min);
- Depois de escurecida retirou-se a solução e uma solução limpa, nas mesmas concentrações foi acrescentada. agitou-se lentamente até que as bandas ficassem com a intensidade desejada;
- Retirou-se a solução de Na_2CO_3 e formaldeído e fez-se duas lavagens de 15 seg com dH_2O ;
- Retirou-se a dH_2O e adicionou-se uma solução de ácido acético a 10% até que cobrisse o gel por um período de 5 minutos ou mais em agitação lenta;
- Retirou-se a solução de ácido acético e fez-se duas lavagens de 15 seg com dH_2O ;
- Retirou-se a dH_2O e adicionou-se uma solução de glicerol a 5% até que cobrisse o gel por um período de 10 min em agitação lenta.

2.5 Detecção de Mutações por SSCA

Em condições não desnaturantes as fitas simples de DNA adotam uma conformação específica e dependente de sua seqüência de nucleotídeos, o que

determina sua mobilidade eletroforética. Este fenômeno serve de base para detectar alterações de seqüência em um determinado fragmento, quando este é colocado para correr em um gel de acrilamida não desnaturante.

A técnica de SSCA foi utilizada para a análise dos éxons: 1; 2; 4; 6a; 6b; 7; 10; 13; 16; 17a; 19; 22 e 24. As condições dos ciclos de PCR são as descritas na tabela 5.

2.5.1 Preparo após a amplificação

Depois de terminada a PCR foi adicionado a cada tubo 90µl de água bi-distilada (ddH₂O).

Se o fragmento deveria ser digerido, 8 µl do produto final da diluição foi colocado em um tubo contendo 2,5 µl do tampão de digestão específico da enzima e 4 unidades da enzima. O volume foi completado para 25 µl com ddH₂O, homogeneizado e incubado durante a noite na temperatura recomendada.

Se não havia a necessidade de digestão, foi colocado em um tubo 8 µl do produto final da diluição e completou-se até o volume de 25 µl com ddH₂O.

Após o procedimento inicial necessário foi adicionado 25 µl de tampão de corrida para SSCA (Formamida 95%; EDTA 20 mM pH 8,0; Azul de bromofenol 0,05%; Xileno cianol FF 0,05%; NaOH 10 mM). As amostras foram desnaturadas (2 min a 98°C), colocadas em gelo e 10µl foram aplicados em um gel de acrilamida.

2.5.2 Condições de Digestão e Migração

As condições para análise em SSCA foram otimizadas para cada éxon, utilizando como controles 60 mutações conhecidas, amavelmente cedidas pelo Departamento de Genética do Institut de Recerca Oncològica do Hospital Duran I Reynals (Barcelona – Espanha). O tamanho ótimo dos fragmentos que devem ser analisados por SSCA está ao redor de 200 nucleotídeos. Devido ao fato de que os

fragmentos amplificados pela PCR são geralmente maiores, é necessário realizar a digestão com enzimas de restrição.

As enzimas utilizadas na digestão, o tempo de corrida de cada éxon e o tamanho dos fragmentos esperados para os éxons analisados estão apresentados na tabela 7. O éxon 1 não necessita digestão.

TABELA 7. ENZIMAS UTILIZADAS NA DIGESTÃO, O TEMPO DE CORRIDA DE CADA ÉXON E O TAMANHO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS PARA OS ÉXONS ANALISADOS POR SSCA

Éxon	Oligonucleotídeos Iniciadores	Produto Amplificado (pb)	Enzima de Restrição	Tempo de Corrida (horas)	Fragmentos Esperados (pb)
1	I1D9	192	S.D.	20	192
	I1-3				
2	2i-5	378	<i>Mbo II</i>	21	199/146/33
	2i-3				
4	I4D1	372	<i>Eco NI</i>	25	235/69/68
	I4R1				
6a	6ai-5	385	<i>Scr FI</i>	25	236/130/19
	6ai-3				
6b	I6bD1	331	<i>Alu I</i>	14	201/130
	6bi-3				
7	I7D1	646	<i>Fok I</i>	16	300/190/156
	I7R1				
10	10i-5	493	<i>Xmn I</i>	25	259/234
	10i-3				
13	13i-5	532	<i>Hinf I</i>	22	247/206/42/31/6
	13aR1				
	13bD1	498	<i>Hph I</i>	18	250/168/80
	13i-3				
16	I16D1	294	<i>Rsa I</i>	20	193/101
	I16R1				
17a	17ai-5	371	<i>Mbo I</i>	23	213/158
	I17aR1				
19	I19D2	588	<i>Bgl II</i>	28	322/266
	I19R2				
22	I22D2	339	<i>Hae III</i>	17	178/161
	22i-3				
24	24i-5	458	<i>Eco NI</i>	22	251/207
	I24R1				

FONTE: CHILLÓN, 1994

NOTAS: - S.D. – Sem Digestão

- Fragmentos em negrito são os segmentos que, após a digestão, continham os éxons de interesse e que, portanto, foram os analisados posteriormente.

2.6 Detecção de Mutações por DGGE

Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) é uma metodologia introduzida recentemente na biologia molecular. Ela tem sido usada para detectar diferenças no comportamento de desnaturação de pequenos fragmentos de DNA (200 – 700 pb) que diferem por poucos ou apenas um único par de base.

Quando a dupla fita de DNA está sujeita a um ambiente progressivamente desnaturante ela se funde parcialmente. Com o aumento das condições desnaturantes do meio o fragmento de DNA irá se dissociar completamente. Esta desnaturação física do fragmento de DNA não é realizada de modo semelhante a um zíper. Com a entrada do fragmento de DNA nas condições desnaturantes, porções pequenas do fragmento irão desnaturar. Como uma consequência desta alteração conformacional, de dupla para simples fita, a migração do fragmento de DNA através do gel é drasticamente desacelerada. O fragmento de DNA de dupla fita irá migrar mais rápido que o fragmento de DNA de fita simples.

Como o fragmento de DNA de fita dupla está migrando através de um gradiente desnaturante progressivo ele se dissocia parcial e progressivamente e sofre tanto uma alteração conformacional quanto de mobilidade.

Uma temperatura constante (entre 45 e 60°C) e desnaturantes químicos (um agente 100% desnaturante é composto de formamida a 40% e Ureia a 7,0 M) são utilizados na prática. Na técnica de DGGE o gradiente desnaturante é criado através de um aparelho específico que gera a variação desejada.

A técnica de DGGE foi utilizada para a análise dos éxons: 3; 5; 8; 9; 11; 12; 14a; 14b; 15; 17b; 18; 20; 21; e 23. As condições dos ciclos de PCR são as descritas na tabela 5. Na tabela 8 são apresentados os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, o gradiente de desnaturação, a voltagem, a temperatura e o tempo de corrida.

TABELA 8. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES, GRADIENTE DE DESNATURAÇÃO, VOLTAGEM, TEMPERATURA E TEMPO DE CORRIDA PARA OS ÉXONS ANALISADOS POR DGGE

Éxons	Oligonucleotídeos Iniciadores	Gradiente de Desnaturação	Voltagem	Tempo de Corrida (horas)	Temperatura
3	3i-5 3i-3	10 a 60%	160V	3	50°C
5	I5D1 I5R1	10 a 60%	150V	3	45°C
8	I8D1 I8R1	10 a 60%	150V	3	45°C
9	9i-5 9i-3	10 a 50%	150V	5	55°C
11	I11D1 I11R1	10 a 60%	150V	3	50°C
12	12i-5 12i-3	10 a 60%	160V	3	50°C
14a	I14aD1 14ai-3	10 a 60%	160V	5	55°C
14b	I14bD1 I14bR1	10 a 60%	150V	3	50°C
15	15i-5 15i-3	10 a 60%	160V	5	55°C
17b	17bi-5 17bi-3	10 a 60%	150V	3	50°C
18	18i-5 18i-3	10 a 60%	150V	3	45°C
20	20i-5 20i-3	10 a 60%	160V	5	55°C
21	21i-5 21i-3	10 a 50%	150V	5	55°C
23	I23D1 I23R1	10 a 60%	160V	3	50°C

FONTE: CHILLÓN, 1994

2.7 Sequenciamento de Produtos de PCR

Nos casos em que se obteve um padrão anômalo de bandas quando da utilização da técnica de SSCA ou DGGE e, através da comparação com amostras

controles que apresentavam alterações conhecidas, não se conseguiu identificar qual alteração estava presente na amostra partiu-se para o sequenciamento automático.

Sequenciamento é o processo que nos permite conhecer a ordem ou seqüência de nucleotídeos de um fragmento de DNA. É fundamental para que se possa conhecer quais nucleotídeos são diferentes em um determinado fragmento, em relação a seqüência normal. É necessário uma quantidade importante de cópias do DNA que queremos sequenciar. Isto se pode conseguir mediante amplificação via PCR.

Para o sequenciamento o fragmento a analisar foi amplificado através da PCR dentro das condições previamente descritas. Foi utilizado o seqüenciador automático 373A da Applied Biosystems, composto por um aparato de eletroforese, laser e computador, que recolhe e analisa os dados enviados pelo laser. Como sistema de detecção foram utilizados didesoxinucleotídeos marcados com fluorescências distintas, que posteriormente são recolhidas e analisadas pelo laser.

O procedimento utilizado foi o seguinte:

- Amplificou-se por PCR o fragmento a sequenciar;
- Para eliminar os nucleotídeos e oligonucleotídeos em excesso, o produto de PCR foi purificado. Para isto foi utilizado o sistema de purificação em coluna *Qiaquick-spin* (*Quiagen*, #28106);
- Pegou-se 1µg de produto;
- Usou-se o Kit *Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*, #401113) seguindo-se o protocolo recomendado;
- Purificou-se o produto da PCR de sequenciamento através da passagem por uma coluna de G-50 (30g de G-50 com 300ml de TE 10/1. Agitou-se por 30min a 65°C. Substituiu-se três vezes o sobrenadante por TE 10/1 agitando-se a 65°C. Autoclavou-se e o produto foi liofilizado em câmara de vácuo;
- O produto foi ressuspenso em 5 µl de tampão (proporção de 1:5 de EDTA 50mM pH 8,0 e Formamida desionizada). Agitou-se. Desnaturou-se (2 minutos a 95°C). Colocou-se no gelo por 5 minutos;
- Fez-se um gel de acrilamida 6% (ver item 2.9). Pré-equilibrou-se durante 3 minutos a 30W. Aplicou-se as amostras. Correu por 12 horas a 30W;

- Os dados foram recolhidos e analisados pelos programas *Collection e Analysis* da *Applied Biosystems*.

2.8 Eletroforese em Géis de Agarose

Os géis de agarose são utilizados para separar os fragmentos de DNA segundo o seu tamanho, fazendo com que ele passe através de um campo elétrico. O DNA se visualiza através da coloração do gel de agarose com brometo de etídeo, o qual se intercala entre as timinas e provoca fluorescência quando o DNA é irradiado com raios ultravioleta de 300nm.

Existem distintos tipos de agarose, dependendo de o que se deseja fazer com o DNA. Assim, para fazer a simples observação dos fragmentos de DNA foi utilizada uma agarose normal. Para observar fragmentos de DNA de baixo peso molecular foi utilizada a agarose NuSieve (FMC, #50082).

Protocolo:

- Pesou-se a agarose na porcentagem desejada, geralmente a 1 ou 2% (a migração dos fragmentos é em função da concentração da agarose);
- Dissolveu-se a agarose em TBE 1X (TrisHCl 90mM; Ácido Bórico 72mM; EDTA 2,4mM. Ajustar o pH em 8,3 com Ácido Acético);
- Aqueceu-se a mistura em um microondas por aproximadamente 1 minuto (até que fosse observada uma mistura absolutamente homogênea);
- Verteu-se a agarose sobre um molde, colocando-se um pente para que fossem feitos os pocinhos nos quais posteriormente foi aplicado o DNA;
- Após solidificada, colocou-se em uma cuba de eletroforese e adicionou-se TBE 1X até que o gel estivesse coberto;
- Adicionou-se corante [0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 40% (p/v) de sacarose em água] na proporção de 1:6 às amostras de DNA. Aplicou-se as amostras nos pocinhos;

- Conectou-se a uma fonte elétrica. Deixou-se correr até que as bandas de DNA estivessem na posição adequada;
- Visualizou-se em transiluminador.

2.9 Eletroforese em Géis de Acrilamida

Da mesma forma que a eletroforese em géis de agarose, os géis de acrilamida são utilizados para separar os fragmentos de DNA de acordo com seu tamanho, fazendo com que eles passem através de um campo elétrico. Os géis de acrilamida são utilizados, frente aos géis de agarose, para observar fragmentos menores de DNA ou para separar fragmentos com poucas bases de diferença de tamanho. A visualização do DNA é mediante a coloração com brometo de etídio, coloração com prata (vide item 2.4.1), ou por fluorescência (no sequenciamento automático). A eletroforese em acrilamida foi utilizada para sequenciamento automático, SSCA, DGGE, visualização de marcadores internos do gene e visualização de bandas de DNA.

2.9.1 Protocolo geral:

Existem diferenças significativas no protocolo, tanto na composição e concentração da acrilamida, como nas condições de eletroforese.

- Lavou-se os vidros com água e sabão. Os vidros podem ser grandes (40x45cm) ou pequenos (20x20cm). Desengordurou-se com álcool absoluto. Colocaram-se os espaçadores e o pente;
- Fez-se a solução de acrilamida na porcentagem de uso (geralmente a 6%). Adicionou-se Persulfato de Amônio (APS - a uma concentração final de 0,05%) e TEMED (a uma concentração final de 0,05%). Misturou-se;
- Pegou-se a solução com uma seringa de 50ml e verteu-se entre os vidros. Deixou-se polimerizar por 1 hora;

- Colocou-se na cuba de eletroforese, adicionou-se tampão TBE 1X e deixou-se pré-equilibrar por 30min nas condições posteriores de eletroforese;
- Adicionou-se corante às amostras e aplicaram-se as amostras no gel;
- O processamento posterior do gel dependeu da técnica de visualização utilizada (brometo de etídio, coloração com prata ou fluorescência).

2.9.2 Géis de Sequenciamento Automático

A porcentagem de acrilamida utilizada foi de 6%. Fez-se previamente uma solução estoque de 40%. As condições de eletroforese estão descritas no item 2.7 – Sequenciamento de Produtos de PCR.

- Solução estoque de 40% (19:1): 380g de acrilamida; 20g de bisacrilamida. Completar até 1 litro com ddH₂O. Dissolver por agitação a 50°C. Para eliminar restos de nucleotídeos com fluorescência, que interfeririam no laser, desionizar por agitação suave com 10g de Amberlite (Sigma, #MB-1A) no escuro. Filtrar no vácuo. Armazenar no escuro a 4°C.
- TBE 10X: TrisHCl 900 mM; Ácido Bórico 720mM; EDTA 24mM. Ajustar o pH a 8,3 com Ácido Acético.
- Solução 6%: 30ml de solução estoque de 40%; 100g de Urea; 45ml de ddH₂O. Dissolver 30min a 65°C. Desionizar por agitação suave com 1,5g de Amberlite no escuro. Filtrar no vácuo. Adicionar 20ml de TBE 10X
- Completar para 200ml com ddH₂O. Armazenar a 4°C no escuro.

2.9.3 Géis para SSCA

A porcentagem de acrilamida utilizada foi de 6% ou de 12%. Foi feita, previamente, uma solução estoque de acrilamida a 40%, com relação a relação acrilamida:bisacrilamida 39:1. As condições de eletroforese estão descritas no item 2.5.

- Solução estoque de 40% (39:1): 390g de acrilamida; 10g de bisacrilamida. Completar até 1 litro com ddH₂O. Dissolver por agitação a 50°C. Armazenar no escuro a 4°C.
- TBE 10X: TrisHCl 900 mM; Ácido Bórico 720mM; EDTA 24mM. Ajustar o pH a 8,3 com Ácido Acético.
- Solução 6%: 15ml de solução estoque a 40% (30ml se a porcentagem usada for de 12%); 10ml de TBE 10X. Completar até 100ml com ddH₂O. Adicionar glicerol se necessário. Misturar.

A visualização dos géis de SSCA foi feita através da utilização de coloração por prata (vide item 2.4.1).

2.9.4 Géis para DGGE

Os géis para DGGE são feitos em aparato específico, conhecidos como *gradient maker*, visto que há a necessidade de que seja formado um gradiente na concentração de acrilamida e de agente desnaturante no gel. Neste trabalho foi utilizado o *BioRad Model 475 Gradient Delivery System*.

A concentração de acrilamida utilizada foi de 6,5% e a faixa de condição desnaturante foi de 10 a 60% para a maioria dos éxons analisados (tab. 8). Uma solução 100% desnaturante foi definida como aquela que continha 40% (v/v) de formamida mais 7,0 M de Uréia em uma solução de 6,5% de acrilamida/bisacrilamida (36,5:1).

Os géis foram criados seguindo-se o protocolo sugerido pela BioRad, com exceção da quantidade de APS (que foi de 0,8% ao invés de 1%) e de TEMED (que foi de 0,08% ao invés de 0,1%).

Os géis foram montados nos aparatos próprios do fabricante (formados por vidros de 16 x 18cm e espaçadores de 1,5mm). O volume final do gel foi de aproximadamente 40ml.

Os géis foram equilibrados (fez-se uma corrida prévia, sem amostra) a uma temperatura ambiente por 30 minutos. As condições de eletroforese estão descritas no item 2.6

- Solução estoque de 40% (36,5:1): 365g de acrilamida; 10g de bisacrilamida. Completar até 1 litro com ddH₂O. Dissolver por agitação a 50°C. Armazenar no escuro a 4°C.
- TAE 50X: 242,0g de TrisBase; 57,1ml de Ácido Acético Glacial; 100ml EDTA 0,5M pH 8,0.
- Solução 0% desnaturante: 16,25ml de acrilamida 40%; 2,0ml de TAE 50X. Completar até 100ml com ddH₂O.
- Solução 100% desnaturante: 16,25ml de acrilamida 40%; 2,0ml de TAE 50X; 40,0ml de formamida; 42,0g de Uréia. Completar até 100ml com ddH₂O.

A concentração de acrilamida nas soluções desnaturantes já estava na concentração de uso: 6,5%. Depois de realizada a corrida o gel foi corado com uma solução de 0,01% de brometo de etídio na concentração de 10 mg/ml e visualizado em câmara escura com a utilização de trasniluminador.

2.9.5 Géis para coloração com Brometo de Etídio

A porcentagem de acrilamida utilizada varia de 6% a 15%. Faz-se previamente uma solução estoque a 40%. Este tipo de gel é utilizado para observar fragmentos pequenos de DNA ou separar fragmentos com poucas bases de diferença de tamanho (tipo microssatélites), para visualizar resultados de PCR ou digestões enzimáticas. Utilizam-se os vidros pequenos (20x20cm).

- Fez-se o gel na porcentagem desejada (protocolo geral item 2.9.1);
- Pegou-se a amostra de DNA e misturou-se com corante [0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e 40% (p/v) de sacarose em água] na proporção de 1:5;

- Aplicou-se as amostras no gel;
- Correu-se a 150V durante 2-6 horas (dependendo do tamanho do fragmento e da porcentagem da acrilamida utilizada);
- Separou-se os vidros e colocou-se o gel em uma solução aquosa de brometo de etídio (3µg/ml) durante 10min. Visualizou-se com o auxílio do transiluminador, com raios ultravioletas.
- Solução estoque de 40% (19:1): 380g de acrilamida; 20g de bisacrilamida. Completar até 1 litro com ddH₂O. Dissolver por agitação a 50°C. Armazenar no escuro a 4°C.
- TBE 10X: TrisHCl 900 mM; Ácido Bórico 720mM; EDTA 24mM. Ajustar o pH a 8,3 com Ácido Acético.
- Solução 6%: 15ml de solução estoque a 40%; 10ml de TBE 10X. Completar até 100ml com ddH₂O. Misturar.

2.10 Estratégias da Análise Molecular

As amostras coletadas, juntamente com os dados clínicos, étnicos e epidemiológicos dos pacientes, foram processadas e analisadas no Laboratório de Fibrose Cística do Departamento de Genética do Institut de Recerca Oncològica (IRO) do Hospital Duran i Reynals, Barcelona, Catalunha, Espanha de fevereiro a outubro de 1996. Após esta data, as análises foram concluídas no Laboratório de Polimorfismos e Ligação Humana do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná e no Centro de Aconselhamento e Laboratório de Genética – Genetika.

A identificação dos marcadores, dos polimorfismos e das mutações presentes na amostra, ocorreu em várias etapas:

1. Análise dos microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA em todas as amostras de afetados e nos respectivos pais, para que se pudesse levantar os haplótipos dos marcadores em questão;

2. Análise da mutação $\Delta F508$ em pacientes e seus pais;
3. SSCA para os éxons 1; 2; 4; 6a; 6b; 7; 10; 13; 16; 17a; 19; 22 e 24 nos indivíduos afetados e que ainda não apresentavam as duas mutações identificadas;
4. Análise das alterações encontradas;
5. Identificação da mutação – sequenciamento e digestão;
6. Análise das mutações encontradas nos genitores para que se pudesse saber a origem;
7. DGGE para os éxons 3; 5; 8; 9; 11; 12; 14; 15; 17b; 18; 20; 21; e 23 nos indivíduos afetados e que ainda não apresentavam as duas mutações identificadas;
8. Identificação da mutação – sequenciamento ou digestão
9. Análise das mutações encontradas nos genitores para que se pudesse saber a origem;
10. Análise do marcador IVSt6-9(n) e a sua segregação
11. Análise do marcador IVS6aGATT e a sua segregação
12. Análise da segregação do marcador T854/*Ava II* [(a identificação de indivíduos com este polimorfismo foi realizada durante o DGGE do éxon 14a, onde ele é facilmente identificado. Para a sua confirmação foi seguido o procedimento padrão para este marcador (vide item 2.4)]

Sempre que um indivíduo tinha as suas duas mutações identificadas a análise genotípica era dada como concluída e passava-se para a análise dos outros marcadores intra-gênicos.

2.11 Análises Estatísticas

2.11.1 Freqüência das mutações, polimorfismos e marcadores

As freqüências alélicas das variantes do gene CFTR, bem como dos marcadores IVS8CA, IVS17BTA, IVS17BCA, IVS6aGATT, T854/*Ava II*, e IVS8-T(n) foram obtidos através da fórmula:

$$x = \frac{n}{2N}$$

onde x = freqüência relativa do alelo em questão.
 n = freqüência absoluta do alelo em questão.
 N = número total de indivíduos.

2.11.2 Análise das freqüências haplotípicas

As freqüências haplotípicas foram calculadas por simples contagem gênica. O poder de associação alélica foi descrito pelo coeficiente de desequilíbrio padronizado (KRAWCZAK e cols., 1988) e calculado como $k(1-k)(q-p) / [k(1-k)][(1-k)p+kq][1-(1-k)p-kq]^{1/2}$, aonde p e q denotam as freqüências do marcador ou haplótipo em cromossomos com alelos selvagens (p) e alelos mutados (q) respectivamente, e k foi a freqüência de mutações da fibrose cística na população estudada. Para análises envolvendo apenas dois fatores, foram utilizados Teste do qui-quadrado ou Teste de Fischer.

2.11.3 Desequilíbrio de Ligação

Os coeficientes de desequilíbrio de ligação (Δ) para pares de *loci* foram calculados como detalhado por MATTIUZ e cols. (1970), através da fórmula:

$$\Delta_{ij} = \sqrt{\frac{d}{n}} - \sqrt{\frac{(b+d)}{n} \times \frac{(c+d)}{n}}$$

onde: n = número total de indivíduos genotipados para ambos os *loci*.

a, b, c, d = número de indivíduos com combinações genóticas particulares de dois alelos S_i e S_j : $a_i a_j$, $a_i b_j$, $b_i a_j$ e $b_i b_j$ respectivamente.

O desequilíbrio de ligação relativo (ΔR) é definido como a proporção do desequilíbrio com relação a um valor máximo de desequilíbrio e é expresso pela fórmula:

$$\Delta R = \frac{\Delta}{|\Delta_{\text{máx}}|}$$

onde $\Delta_{\text{máx}}$ é expresso para um haplótipo $A_i B_j$ de 2 *loci* como (IMANISHI e cols., 1992):

$\Delta_{\text{máx}}$ = frequência do alelo menos comum (a_i ou b_j) menos o produto deles quando Δ for maior ou igual a 0.

$\Delta_{\text{máx}}$ = maior valor entre 0 ou $(a_i + b_j - 1)$ menos o produto dos alelos a_i e b_j quando Δ for menor que 0.

Sendo que ΔR sempre assumirá valores entre -1 e +1.

A significância do desvio foi determinada pelo método de qui-quadrado.

Para obtenção dos valores de desequilíbrio de ligação, foi utilizado o programa DESLIG (PROBST e cols., 2000).

3 OBJETIVOS

1. Determinar em pacientes euro-brasileiros com FC proveniente de 2 estados brasileiros (Estados do Paraná e Santa Catarina) e em pacientes afro-brasileiros provenientes do Estado de Minas Gerais, a frequência gênica das mutações no gene CFTR;

2. Determinar a frequência dos haplótipos formados pelos seis marcadores intra-gênicos em CFTR em cromossomos mutados para os grupos continentais euro-brasileiro e afro-brasileiro;

3. Determinar a frequência dos haplótipos formados pelos microssatélites IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA em CFTR em cromossomos normais e mutados para os grupos continentais euro-brasileiro e afro-brasileiro;

4. Tentar identificar novas mutações e novos polimorfismos no gene CFTR;

5. Estabelecer um painel de frequências de mutações e haplótipos do gene da fibrose cística na população brasileira para os grupos continentais euro-brasileiro e afro-brasileiro;

6. Analisar se existe correlação entre os haplótipos dos marcadores internos do gene com as mutações nas amostras analisadas;

7. Tentar identificar possíveis mutações nos microssatélites com a consequente geração de alelos novos nas amostras analisadas.

4 RESULTADOS

4.1 Marcadores Intra-Gênicos de CFTR

4.1.1 Frequência alélica dos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA

Na tabela 9 é apresentada a frequência alélica dos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA classificados por grupo continental, em cromossomos normais e em cromossomos mutados.

O tetranucleotídeo IVS6aGATT tem, como descrito anteriormente (CHEHAB e cols., 1991; GASPARINI e cols., 1991), somente dois alelos comuns com seis e sete repetições, sendo que a frequência média destes dois alelos em cromossomos normais de populações de origem européia é de 28,47% e 71,53% para o alelo 6 e 7 respectivamente (MORRAL e cols., 1996; MATEU e cols., 2001). Este marcador não foi tipado em cromossomos normais, apenas nos cromossomos mutados e as suas frequências foram de 38,89% (alelo 6) e de 61,11% (alelo 7) no grupo euro-brasileiro. No grupo afro-brasileiro foi encontrado apenas o alelo 6, porém só foram analisados 4 cromossomos.

O microssatélite IVS8CA teve uma distribuição não uniforme de seus alelos, sendo que os alelos 16 e 17 corresponderam a 76,09% da frequência global deste marcador. Os alelos encontrados variaram de 14 a 26 repetições. O alelo mais

TABELA 9. FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS MARCADORES IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, E IVS17bCA

continua

Marcador	Alelo	Euro-brasileiros				Afro-brasileiros			
		mutados ¹		normais ¹		mutados ¹		normais ¹	
		N	%	n	%	n	%	n	%
IVS6aGATT	6	35	38,88	NT		4	100,00	NT	
	7	55	61,11	NT		0	0	NT	
IVS8CA	14	0	0,00	5	4,72	0	0,00	0	0,00
	15	0	0,00	3	2,83	0	0,00	0	0,00
	16	37	33,04	62	58,49	25	59,52	23	69,70
	17	41	36,61	20	18,87	7	16,67	5	15,15
	18	3	2,68	2	1,89	0	0,00	0	0,00
	19	0	0,00	0	0,00	1	2,38	0	0,00
	21	1	0,89	3	2,83	0	0,00	1	3,03
	22	0	0,00	0	0,00	1	2,38	0	0,00
	23	28	25,00	9	8,49	7	16,67	4	12,12
	24	0	0,00	2	1,89	0	0,00	0	0,00
	25	1	0,89	0	0,00	1	2,38	0	0,00
	26	1	0,89	0	0,00	0	0,00	0	0,00
IVS8-T(n)	5	0	0,00	3	3,90	0	0,00	0	0,00
	7	30	32,97	63	81,82	6	60,00	4	100,00
	9	61	67,03	11	14,29	4	40,00	0	0,00
T854/ <i>Ava II</i>	1	70	81,40	NT		12	48,00	NT	
	2	16	18,60	NT		13	52,00	NT	
IVS17bTA	7	8	7,14	23	22,33	8	20,00	7	21,21
	8	0	0,00	1	0,97	0	0,00	0	0,00
	19	0	0,00	1	0,97	0	0,00	1	3,03
	21	1	0,89	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	22	0	0,00	2	1,94	1	2,50	0	0,00
	24	4	3,57	1	0,97	1	2,50	1	3,03
	25	1	0,89	3	2,91	0	0,00	1	3,03
	27	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	6,06
	28	0	0,00	0	0,00	4	10,00	1	3,03
	29	3	2,68	3	2,91	0	0,00	2	6,06
	30	7	6,25	13	12,62	3	7,50	4	12,12
	31	50	44,64	20	19,42	13	32,50	4	12,12
	32	14	12,50	9	8,74	1	2,50	4	12,12
	33	8	7,14	2	1,94	5	12,50	1	3,03
	34	5	4,46	2	1,94	1	2,50	2	6,06
	35	2	1,79	3	2,91	1	2,50	0	0,00
	36	1	0,89	3	2,91	0	0,00	1	3,03
	38	1	0,89	0	0,00	0	0,00	0	0,00
41	1	0,89	1	0,97	0	0,00	0	0,00	

conclusão

Marcador	Alelo	Euro-brasileiros				Afro-brasileiros			
		mutados ¹		normais ¹		mutados ¹		normais ¹	
		n	%	n	%	n	%	n	%
IVS17bTA	42	0	0,00	0	0,00	1	2,50	1	3,03
	43	0	0,00	1	0,97	0	0,00	0	0,00
	44	2	1,79	3	2,91	0	0,00	0	0,00
	45	1	0,89	1	0,97	1	2,50	0	0,00
	46	1	0,89	7	6,80	0	0,00	0	0,00
	47	1	0,89	2	1,94	0	0,00	0	0,00
	48	1	0,89	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	49	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,03
	55	0	0,00	2	1,94	0	0,00	0	0,00
IVS17bCA	11	2	1,79	5	4,72	0	0,00	0	0,00
	13	95	84,82	72	67,92	27	64,29	18	56,25
	14	5	4,46	3	2,83	2	4,76	1	3,13
	16	1	0,89	0	0,00	2	4,76	4	12,50
	17	8	7,14	24	22,64	9	21,43	7	21,88
	18	0	0,00	0	0,00	2	4,76	2	6,25
	19	1	0,89	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	20	0	0,00	1	0,94	0	0,00	0	0,00
	22	0	0,00	1	0,94	0	0,00	0	0,00

FONTE: o autor

NOTAS: - ¹mutados e normais referem-se aos cromossomos mutados e normais.
 - NT – não-testado
 - n – número de cromossomos encontrados para cada marcador

freqüente em todos os grupos foi o de 16 repetições, com exceção do sub-grupo euro-brasileiro de SC, que teve no alelo 17 o seu alelo mais freqüente (56,52%).

O marcador IVS8-T(n) apresentou, na análise dos cromossomos mutados, apenas dois dos três alelos já descritos, sendo que o mais freqüente no grupo euro-brasileiro foi o alelo 9 (67,03%) e no grupo afro-brasileiro foi o alelo 7 (60%). Entre os cromossomos normais foram encontrados os três alelos descritos previamente. Tanto no grupo euro-brasileiro como no afro-brasileiro o mais freqüente foi o alelo 7, sendo que no grupo euro-brasileiro ele apresentou uma freqüência de 81,82% e no grupo afro-brasileiro a freqüência encontrada foi de 100%, porém neste último foram analisados somente 4 cromossomos.

O microsatélite IVS17bTA é extremamente polimórfico. Os alelos encontrados variaram de 7 a 45 nos cromossomos mutados e de 7 a 55 nos

cromossomos normais. Este marcador apresenta uma distribuição multimodal e está normalmente distribuído em quatro grupos descontínuos (MATEU e cols., 2001). Nas amostras analisadas os grupos ficaram assim distribuídos: alelo 7 (e 8 em um cromossomo), alelos 19-25, 27-38 e 41-55. Na média, o grupo 27-38 foi o mais freqüente (freqüência média global = 77,86%, entre os cromossomos mutados, e 56,84% entre os cromossomos normais), e, dentro deste grupo, o alelo 31 foi o mais freqüente entre os cromossomos analisados. O alelo 37 não estava presente em nenhum dos grupos analisados. O alelo 7 foi encontrado em todos os grupos e – com exceção do alelo 8 encontrado em um cromossomo – o próximo alelo em tamanho foi o alelo 19. O alelo 7 foi encontrado com menor freqüência no grupo de cromossomos mutados euro-brasileiros (PR=7,6% e SC=6,5%). Nos demais grupos a freqüência deste alelo foi superior a 20,00%. No grupo de alelos 19-25, o alelo 24 foi o mais freqüente entre os cromossomos mutados e o alelo 25 o mais freqüente entre os cromossomos normais, sendo que a freqüência média deste grupo foi de 5,14% e 7,34% para o grupo mutado e normal respectivamente. Os alelos 20 e 23 não estavam presentes em nenhum dos grupos analisados. O último grupo de alelos (41-55) apresentou uma freqüência média de 5,64% entre os cromossomos mutados e de 13,09% entre os cromossomos normais. Neste último grupo de alelos a maioria é rara ou ausente, com exceção dos alelos 44, 45 e 46 (MATEU e cols., 2001).

O microssatélite IVS17bCA teve nove alelos encontrados, variando de 11 a 22 repetições. O alelo mais freqüente em todos os grupos analisados foi o de 13 repetições, que apresentou freqüências de 79,22% entre os cromossomos mutados e de 65,22% entre os cromossomos normais.

A análise do marcador dialélico T854/*Ava* II mostrou que este é polimórfico em todos os grupos de cromossomos mutados analisados. Novamente este marcador não foi analisado no grupo de cromossomos normais. O alelo 1 (ausência do sítio de restrição para a enzima *Ava* II) foi encontrado com freqüências de 48,00% (afro-brasileiros), 79,25% (euro-brasileiros – PR), e 84,85% (euro-brasileiros – SC).

Devido a problemas técnicos não foi possível identificar o alelo presente em 2,53% dos cromossomos mutados e em 3,47% dos cromossomos normais para o

microsatélite IVS8CA; em 4,40% dos cromossomos mutados e em 7,48% dos cromossomos normais para o microsatélite IVS17bTA; em 2,53% dos cromossomos mutados e em 4,17% dos cromossomos normais para o microsatélite IVS17bCA.

4.1.2 Comparação Estatística das Frequências Alélicas

A tabela 10 apresenta a comparação estatística das frequências alélicas entre cromossomos de indivíduos afetados de diferentes grupos continentais para três microsatélites internos do gene CFTR: IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA.

TABELA 10. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS

Marcador	Alelo	Cromossomos mutados		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Euro-brasileiros	Afro-brasileiros		
IVS8CA	16	37	25	$\chi^2_{(8)} = 17,88$	p < 0,05
	17	41	7		
	18	3	0		
	19	0	1		
	21	1	0		
	22	0	1		
	23	28	7		
	25	1	1		
	26	1	0		
IVS17bTA	7	8	8	$\chi^2_{(21)} = 32,21$	ns
	21	1	0		
	22	0	1		
	24	4	1		
	25	1	0		
	28	0	4		
	29	3	0		
	30	7	3		
	31	50	13		
	32	14	1		
	33	8	5		
	34	5	1		
	35	2	1		

continua

Marcador	Alelo	Cromossomos mutados		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Euro-brasileiros	Afro-brasileiros		
IVS17bTA	36	1	0	$\chi^2_{(6)} = 16,08$	p < 0,02
	38	1	0		
	41	1	0		
	42	0	1		
	44	2	0		
	45	1	1		
	46	1	0		
	47	1	0		
	48	1	0		
IVS17bCA	11	2	0		
	13	95	27		
	14	5	2		
	16	1	2		
	17	8	9		
	18	0	2		
	19	1	0		

FONTE: o autor

NOTAS: - G.L. – Graus de Liberdade
- ns – não significativo

Pela análise dos três microssatélites observou-se que apenas o IVS17bTA não apresentou diferença significativa na comparação entre os afetados euro-brasileiros e afro-brasileiros.

Na tabela 11 pode ser observada a comparação das freqüências alélicas dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA entre cromossomos normais para os grupos euro-brasileiro e afro-brasileiro. Nesta comparação apenas o marcador IVS17bCA apresentou diferença significativa (p < 0,01). Para os outros dois microssatélites a diferença encontrada não foi estatisticamente significante.

Como tanto a análise em cromossomos mutados quanto em cromossomos normais para o marcador IVS17bTA não apresentou diferença significativa, as amostras de cromossomos normais e cromossomos mutados foram unidas e fez-se a análise entre eles (tab. 12). Esta análise se apresentou significativa com p < 0,01.

TABELA 11. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS

Marcador	Alelo	Cromossomos normais		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Euro-brasileiros	Afro-brasileiros		
IVS8CA	14	5	0	$\chi^2_{(7)} = 4,80$	ns
	15	3	0		
	16	62	23		
	17	20	5		
	18	2	0		
	21	3	1		
	23	9	4		
	24	2	0		
IVS17bTA	7	23	7	$\chi^2_{(24)} = 27,74$	ns
	8	1	0		
	19	1	1		
	22	2	0		
	24	1	1		
	25	3	1		
	27	0	2		
	28	0	1		
	29	3	2		
	30	13	4		
	31	20	4		
	32	9	4		
	33	2	1		
	34	2	2		
	35	3	0		
	36	3	1		
	41	1	0		
	42	0	1		
	43	1	0		
	44	3	0		
45	1	0			
46	7	0			
47	2	0			
49	0	1			
55	2	0			
IVS17bCA	11	5	0	$\chi^2_{(7)} = 22,52$	p < 0,01
	13	72	18		
	14	3	1		
	16	0	4		
	17	24	7		
	18	0	2		
	20	1	0		
	22	1	0		

FONTE: o autor

NOTAS: - G.L. – Graus de Liberdade
- ns – não significativo

TABELA 12. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS17bTA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS

Marcador	Alelo	mutado	normal	$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
IVS17bTA	7	16	30	$\chi^2_{(27)} = 54,52$	p < 0,01
	8	0	1		
	19	0	2		
	21	1	0		
	22	1	2		
	24	5	2		
	25	1	4		
	27	0	2		
	28	4	1		
	29	3	5		
	30	10	17		
	31	63	24		
	32	15	13		
	33	13	3		
	34	6	4		
	35	3	3		
	36	1	4		
	38	1	0		
	41	1	1		
	42	1	1		
	43	0	1		
	44	2	3		
	45	2	1		
	46	1	7		
	47	1	2		
	48	1	0		
	49	0	1		
55	0	2			

FONTE: o autor

NOTA: - G.L. – Graus de Liberdade

Na tabela 13 está apresentada a comparação estatística das frequências alélicas entre cromossomos mutados e normais entre euro-brasileiros para os microssatélites internos IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA.

Esta análise mostrou diferença significativa para os três marcadores (p<0,001 - IVS8CA; p<0,01 - IVS17bTA; e p<0,02 IVS17bCA).

TABELA 13. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS EM EURO-BRASILEIROS

Marcador	Alelo	Euro-brasileiros		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Mutado	Normal		
IVS8CA	14	0	5	$\chi^2_{(9)} = 36,36$	p < 0,001
	15	0	3		
	16	37	62		
	17	41	20		
	18	3	2		
	21	1	3		
	23	28	9		
	24	0	2		
	25	1	0		
	26	1	0		
IVS17bTA	7	8	23	$\chi^2_{(23)} = 46,63$	p < 0,01
	8	0	1		
	19	0	1		
	21	1	0		
	22	0	2		
	24	4	1		
	25	1	3		
	29	3	3		
	30	7	13		
	31	50	20		
	32	14	9		
	33	8	2		
	34	5	2		
	35	2	3		
	36	1	3		
	38	1	0		
	41	1	1		
	43	0	1		
44	2	3			
45	1	1			
46	1	7			
47	1	2			
48	1	0			
55	0	2			
IVS17bCA	11	2	5	$\chi^2_{(7)} = 16,80$	p < 0,02
	13	95	72		
	14	5	3		
	16	1	0		
	17	8	24		
	19	1	0		
	20	0	1		
22	0	1			

FONTE: o autor

NOTA: - G.L. – Graus de Liberdade

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos da comparação estatística entre cromossomos normais e mutados no grupo afro-brasileiro para os microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA.

TABELA 14. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA ENTRE CROMOSSOMOS NORMAIS E MUTADOS EM AFRO-BRASILEIROS

Marcador	Alelo	Afro-brasileiros		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Mutado	Normal		
IVS8CA	16	25	23	$\chi^2_{(6)} = 4,22$	ns
	17	7	5		
	19	1	0		
	21	0	1		
	22	1	0		
	23	7	4		
	25	1	0		
IVS17bTA	7	8	7	$\chi^2_{(17)} = 22,11$	ns
	19	0	1		
	22	1	0		
	24	1	1		
	25	0	1		
	27	0	2		
	28	4	1		
	29	0	2		
	30	3	4		
	31	13	4		
	32	1	4		
	33	5	1		
	34	1	2		
	35	1	0		
	36	0	1		
42	1	1			
45	1	0			
49	0	1			
IVS17bCA	13	27	18	$\chi^2_{(4)} = 1,73$	ns
	14	2	1		
	16	2	4		
	17	9	7		
	18	2	2		

FONTE: o autor

NOTAS: - G.L. – Graus de Liberdade
- ns – não significativo

A análise destes três marcadores dentro de um mesmo grupo continental não se mostrou significativa para nenhum deles.

Analisando-se as frequências dos alelos do marcador IVS8-T(n) entre indivíduos euro-brasileiros pode-se observar que o alelo 5 está presente apenas nos cromossomos normais, e que o alelo 9 é o mais freqüente entre os cromossomos mutados. Fazendo-se uma análise estatística para este marcador dentro do grupo euro-brasileiro (confrontando-se mutados e normais) observa-se um $\chi^2_{(1)} = 30,62$, sendo que o valor de p fica inferior a 0,001 (tab.15).

TABELA 15. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS8-T(n), ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS E NORMAIS NO GRUPO EURO-BRASILEIRO

Marcador	Alelo	Euro-brasileiros		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Mutados	Normais		
IVS8-T(n)	5	0	3	$\chi^2_{(1)} = 30,62$	p < 0,001
	7	30	63		
	9	61	11		

FONTE: o autor

NOTA: - G.L. – Graus de Liberdade

A tabela 16 apresenta a comparação estatística das frequências alélicas entre cromossomos de indivíduos afetados de diferentes grupos continentais para três microssatélites internos do gene CFTR: IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/Ava II.

TABELA 16. COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/Ava II ENTRE CROMOSSOMOS MUTADOS DE DIFERENTES GRUPOS CONTINENTAIS

Marcador	Alelo	Cromossomos mutados		$\chi^2_{(G.L.)}$	Significância
		Euro-brasileiros	Afro-brasileiros		
IVS6aGATT	6	35	5	$\chi^2_{(1)} = 7,26$	p < 0,01
	7	55	0		
IVS8-T(n)	7	30	6	$\chi^2_{(1)} = 2,87$	ns
	9	61	4		
T854/Ava II	1	70	12	$\chi^2_{(1)} = 11,19$	p < 0,001
	2	16	13		

FONTE: o autor

NOTAS: - G.L. – Graus de Liberdade

- ns – não significativo

Observando-se a comparação entre os afetados dos dois grupos foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os marcadores IVS6aGATT ($p < 0,01$) e T854/*Ava II* ($p < 0,001$).

4.2 Haplótipos de CFTR

No apêndice 4 podem ser observado os haplótipos formados pelos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA entre os cromossomos mutados encontrados em cada grupo continental, bem como suas respectivas frequências. Nos apêndices 5 e 6 podem ser observados os haplótipos formados apenas pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA, assim como suas frequências, sendo separados por grupo continental e em cromossomos mutados (apêndice 5) e cromossomos normais (apêndice 6).

O grupo euro-brasileiro teve identificado, no total, 37 haplótipos distintos formados pelos seis marcadores internos do gene CFTR, presentes em 63 cromossomos. O haplótipo mais frequente foi o 6-23-9-1-31-13 (respectivamente: IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA), estando presente em 25,40% (16/63) dos cromossomos. O segundo mais frequente foi o 7-17-7-1-31-13, presente em 7,94% (5/63) dos cromossomos.

No grupo afro-brasileiro apenas quatro cromossomos tiveram o seu haplótipo completo (tipados para os seis marcadores internos do gene CFTR) concluído. Nestes quatro cromossomos estavam presentes apenas dois haplótipos, o 6-23-9-1-31-13 presente em 3 cromossomos e o 6-25-9-1-31-13 presente em um.

Na análise do haplótipo formado por apenas três dos marcadores internos do gene CFTR (IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA), foram identificados entre os cromossomos mutados do grupo continental euro-brasileiro 39 haplótipos distintos, sendo que, destes, dois tiveram o alelo IVS17bTA não definido ou não

identificado². Entre os outros 37 haplótipos, o mais freqüente foi o 17-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA, respectivamente), presente em 21,43% (24/112) dos cromossomos. O segundo mais freqüente foi o 23-31-13, presente em 16,07% (18/112) dos cromossomos. De todos os haplótipos encontrados, apenas mais um tinha freqüência superior a 5%, que foi o haplótipo 17-32-13, com uma freqüência de 6,25% (7/112).

Entre os cromossomos mutados afro-brasileiros estavam presentes 27 haplótipos distintos. Destes, apenas 20 haplótipos foram perfeitamente identificados, os outros sete (21,70%) apresentaram algum tipo de problema na tipagem (vide apêndice 5). Não foram tipados dois indivíduos (8,70% dos haplótipos), sendo que os haplótipos presentes em seus cromossomos não foram analisados. Neste grupo, o haplótipo mais freqüente foi o 23-31-13 (IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA, respectivamente), com uma freqüência de 10,87% (5/46). O segundo mais freqüente foi o haplótipo 17-7-17, com uma freqüência de 8,70% (4/46).

A análise dos haplótipos presentes nos cromossomos normais para os marcadores IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA do grupo euro-brasileiro permitiu a identificação de 49 haplótipos distintos, sendo que destes apenas dois apresentaram a tipagem para o marcador IVS17bTA não definida. Entre os 106 cromossomos analisados, o haplótipo mais freqüente foi o 16-7-17 (12,26%) sendo seguido de perto pelos haplótipos 16-30-13 (11,32%) e 16-31-13 (10,38%). Entre todos os outros haplótipos, apenas o haplótipo 16-32-13 (6,60%) apresentou uma freqüência superior a 5%.

Para os cromossomos normais no grupo afro-brasileiro, dos 24 haplótipos identificados entre os 32 cromossomos analisados, cinco (15,65%) apresentaram problemas na tipagem de um dos marcadores (vide apêndice 6). Três haplótipos (16-7-17, 16-30-13 e 16-32-13) apresentaram a freqüência de 9,38%, que foi a mais alta, estando presentes em três cromossomos cada um deles.

² Para melhor compreensão da definição destes dois termos usados neste trabalho vide nota do apêndice 2

4.3 Mutações Identificadas em CFTR

4.3.1 Freqüências alélicas em indivíduos afetados

Na tabela 17 é apresentada a freqüência das mutações identificadas na análise dos indivíduos afetados.

4.3.1.1 *Freqüências alélicas em afetados euro-brasileiros*

Entre os afetados euro-brasileiros, seis das mutações detectadas (Δ F508, G542X, N1303K, R334W, R1162X e G85E) tinham uma freqüência individual superior a 3,5%, sendo que foram detectadas em 66,7% dos cromossomos. Além destas mutações outras três (W1282X, 2183AA:G e R553X) tiveram freqüência superior a 1%, estando presentes em outros 7,14% dos cromossomos analisados.

Foram detectadas no total 25 mutações que corresponderam a 87,5% dos alelos presentes na amostra. A mutação mais freqüente foi a Δ F508, com uma freqüência de 45,54%, e 16 mutações (A561E, Y1092X, 3849+10kb C:T, 711+5G:A, 621+1G:T, G1069R, W1282G, S4X, E585X, 1717-8G:A, 711+1G:T, 1812-1G:A, 1717-1G:A, 232 del 18, R347P, 1898-1G:A) estavam presentes em apenas um cromossomo, com uma freqüência individual de 0,89% e correspondendo a 14,29% do total de alelos presentes na amostra.

4.3.1.2 *Freqüências alélicas em afetados afro-brasileiros*

Entre os afro-brasileiros, seis das mutações detectadas (Δ F508, 3120+1A:G, A561E, G1247R, R1066C, Q552K) apresentaram uma freqüência superior a 3%, sendo que estas mutações foram detectadas em 39,13% dos alelos. A mutação Δ F508

TABELA 17. FREQUENCIA DAS MUTAÇÕES CFTR DETECTADAS EM INDIVÍDUOS AFETADOS

mutação	Euro-brasileiros				Afro-brasileiros		Total	
	PR	SC	Total		n	%	n	%
	n	n	n	%				
ΔF508	26	25	51	45,54	7	15,22	58	36,709
G542X	5	2	7	6,25	0	0,00	7	4,430
N1303K	1	3	4	3,57	1	2,17	5	3,165
R334W	1	3	4	3,57	0	0,00	4	2,532
R1162X	1	3	4	3,57	0	0,00	4	2,532
G85E	2	2	4	3,57	0	0,00	4	2,532
2183 AA:G	1	2	3	2,68	0	0,00	3	1,899
W1282X	1	2	3	2,68	0	0,00	3	1,899
A561E	1	0	1	0,89	2	4,35	3	1,899
3120+1G:A	0	0	0	0,00	3	6,52	3	1,899
R553X	2	0	2	1,79	0	0,00	2	1,266
Y1092X	1	0	1	0,89	1	2,17	2	1,266
G1247R	0	0	0	0,00	2	4,35	2	1,266
R1066C	0	0	0	0,00	2	4,35	2	1,266
Q552K	0	0	0	0,00	2	4,35	2	1,266
3849+10kb C:T	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
711+5G:A	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
621+1G:T	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
G1069R	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
W1282G	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
S4X	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
E585X	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
1717-8G:A	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
711+1G:T	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
1812-1G:A	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
1717-1G:A	1	0	1	0,89	0	0,00	1	0,633
232 del 18	0	1	1	0,89	0	0,00	1	0,633
R347P	0	1	1	0,89	0	0,00	1	0,633
1898-1G:A	0	1	1	0,89	0	0,00	1	0,633
P5L	0	0	0	0,00	1	2,17	1	0,633
565 del C	0	0	0	0,00	1	2,17	1	0,633
I148N	0	0	0	0,00	1	2,17	1	0,633
V232D	0	0	0	0,00	1	2,17	1	0,633
E504X	0	0	0	0,00	1	2,17	1	0,633
Mutações não detectadas	13	1	14	12,54	21	45,65	35	22,147
Total geral	66	46	112	100,00	46	100,00	158	100,00
Detecção (%)	80,30	97,83	87,50		54,35		77,85	

FONTE: o autor

apresentou uma frequência de 15,22%. Sete mutações (N1303K, Y1092X, P5L, 565 del C, I148N, V232D, E504X) estavam presentes em apenas um cromossomo,

correspondendo a 15,22% dos cromossomos analisados. A taxa de detecção no grupo de afro-brasileiros foi de 54,35%.

4.3.2 Freqüências genótípicas em indivíduos afetados

Na tabela 18 é apresentada a freqüência dos genótipos identificados na análise dos indivíduos afetados.

Foram encontrados 42 genótipos diferentes entre os 595 genótipos teoricamente possíveis (levando-se em conta as 34 mutações encontradas).

Entre os indivíduos euro-brasileiros, o genótipo mais freqüente foi o $\Delta F508/\Delta F508$, estando presente em 13 dos 56 genótipos (23,21%). O segundo genótipo mais freqüente foi o $\Delta F508/G542X$, presente em 4 dos 56 genótipos (7,14%). O genótipo formado por duas mutações não identificadas também foi encontrado em 4 indivíduos (7,14%). Nesta amostra foram identificados 30 indivíduos heterozigotos compostos por duas mutações identificadas e diferentes (53,57%), sendo que destes, 22 (39,29%) eram heterozigotos compostos com $\Delta F508$ e, ainda, 10 genótipos (17,86%) apresentavam uma ou ambas as mutações não identificadas (“outra”).

Entre os 31 genótipos identificados, quatro estavam presentes em homozigose em 13 afetados (28,57%), sendo que nenhum dos pacientes informou consangüinidade entre os seus ascendentes. Quarenta e seis indivíduos apresentaram as duas mutações identificadas (82,14%), seis indivíduos tiveram apenas uma mutação identificada (10,71%) e quatro indivíduos não apresentaram nenhuma das mutações definidas (7,14%).

Para os afetados afro-brasileiros, o genótipo mais freqüente foi o “outra”/“outra”, estando presente em 7 dos 23 genótipos (30,43%). O segundo genótipo mais freqüente foi o $\Delta F508$ /“outra”, presente em 3 indivíduos (13,04%) e o terceiro mais freqüente foi o 3120+1G:A/“outra”, presente em dois indivíduos (8,7%). Todos os outros 11 genótipos estavam presentes em apenas um indivíduo, incluindo-se

TABELA 18. FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS CFTR DETECTADOS EM INDIVÍDUOS AFETADOS

Genótipo	Euro-brasileiros				Afro-brasileiros		Total	
	PR	SC	Total		n	%	n	%
	n	n	n	%				
ΔF508 / ΔF508	6	7	13	23,21	1	4,35	14	17,72
ΔF508 / G542X	3	1	4	7,14	0	0,00	4	5,06
ΔF508 / N1303K	0	3	3	5,36	0	0,00	3	3,80
ΔF508 / W1282X	1	2	3	5,36	0	0,00	3	3,80
ΔF508 / G85E	1	1	2	3,57	0	0,00	2	2,53
ΔF508 / Y1092X	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / 3849+10kb C:T	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / W1282G	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / E585X	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / R1162X	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / A561E	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / R553X	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / 232 del 18	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / R347P	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / 1898-1G:A	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
ΔF508 / R1066C	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
ΔF508 / 3120+1G:A	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
G542X / R334W	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
G542X / N1303K	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
G542X / G85E	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
G85E / R1162X	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
711+5G:A / 621+1G:T	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
1717-8G:A / 711+1G:T	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
1812-1G:A / 1717-1G:A	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
R334W / S4X	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
A561E / V232D	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
A561E / R1066C	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
I148N / Y1092X	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
P5L / 565 del C	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
R334W / R334W	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
R1162X / R1162X	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
2183 AA:G / 2183 AA:G	0	1	1	1,79	0	0,00	1	1,27
G1247R / G1247R	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
Q552K / Q552K	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
ΔF508 / outra	2	1	3	5,36	3	13,04	6	7,59
3120+1G:A / outra	0	0	0	0,00	2	8,70	2	2,53
R553X / outra	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
2183 AA:G / outra	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
G1069R / outra	1	0	1	1,79	0	0,00	1	1,27
N1303K / outra	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
E504X / outra	0	0	0	0,00	1	4,35	1	1,27
outra / outra	4	0	4	7,14	7	30,43	11	13,92
Total geral	33	23	56	100,00	23	100,00	79	100,00

FONTE: o autor

o genótipo $\Delta F508/\Delta F508$. Entre os 14 genótipos identificados, três estavam presentes em homozigose em 3 pacientes (13,04%), sendo que apenas um deles relatou consangüinidade em sua ascendência (pais primos em 3º grau).

Entre os 23 afro-brasileiros analisados, 9 (39,13%) apresentara as duas mutações identificadas; 7 (30,43%) apresentaram o genótipo parcialmente definido; e em 7 (30,43%) nenhuma das duas mutações foi identificada.

4.4 Correlação entre Mutações em CFTR e Haplótipos dos Marcadores Intra-Gênicos de CFTR

4.4.1 Frequência dos haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA

A tabela 19 mostra a frequência e a distribuição dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA em cromossomos de afetados dos grupos euro-brasileiro e afro-brasileiro.

TABELA 19. DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DOS GRUPOS EURO-BRASILEIRO E AFRO-BRASILEIRO

mutação	Alelo			euro-brasileiros	afro-brasileiros	total	Frequência (%)
	IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA	(n)	(n)		
$\Delta F508$	16	7	17	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	16	29	14	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	16	31	13	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	17	31/34	13	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	17	30	13	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	17	31	13	20	1	21	17,50
$\Delta F508$	17	32	13	7	0	7	5,83
$\Delta F508$	16/23	33	13	0	1	1	0,83
$\Delta F508$	23	31	13	15	3	18	15,00
$\Delta F508$	23	32	14	1	0	1	0,83
$\Delta F508$	23	46	13	1	0	1	0,83

continua

mutação	Alelo			euro-brasileiros (n)	afro-brasileiros (n)	total	conclusão Frequência (%)
	IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA				
ΔF508	25	30	13	1	0	1	0,83
ΔF508	25	31	13	0	1	1	0,83
ΔF508	26	31	13	1	0	1	0,83
G542X	23	32	13	1	0	1	0,83
G542X	23	33	13	5	0	5	4,17
G542X	23	34	13	1	0	1	0,83
N1303K	23	30	13	1	0	1	0,83
N1303K	23	31	13	3	1	4	3,33
G85E	16	24	13	4	0	4	3,33
R1162X	17	31	13	4	0	4	3,33
R334W	16	34	13	1	0	1	0,83
R334W	16	48	13	1	0	1	0,83
R334W	17	33	13	1	0	1	0,83
R334W	17	41	13	1	0	1	0,83
3120+1G:A	17	7	17	0	3	3	2,50
W1282X	17	7	17	3	0	3	2,50
2183 AA:G	16	31	13	2	0	2	1,67
2183 AA:G	16	31	14	1	0	1	0,83
A561E	16	42	13	0	1	1	0,83
A561E	16	44	13	1	0	1	0,83
A561E	16	45	13	0	1	1	0,83
Q552K	16	28	16	0	2	2	1,67
R1066C	16	33	13	0	2	2	1,67
R553X	17	44	11	1	0	1	0,83
R553X	17	47	11	1	0	1	0,83
Y1092X	16	30	13	1	0	1	0,83
Y1092X	16	31	13	0	1	1	0,83
1717-1G:A	16	7	17	1	0	1	0,83
1717-8G:A	16	33	13	1	0	1	0,83
1812-1G:A	16	31	14	1	0	1	0,83
1898-1G:A	16	45	13	1	0	1	0,83
232 del 18	21	36	13	1	0	1	0,83
3849+10kb C:T	16	7	17	1	0	1	0,83
621+1G:T	18	34	13	1	0	1	0,83
711+5G:A	16	7	17	1	0	1	0,83
711+1G:T	16	25	13	1	0	1	0,83
E585X	16	21	19	1	0	1	0,83
G1069R	17	30	13	1	0	1	0,83
R347P	16	32	13	1	0	1	0,83
S4X	16	nd	13	1	0	1	0,83
W1282G	16	32	14	1	0	1	0,83
565 del C	16	31	13	0	1	1	0,83
E504X	16	31	14	0	1	1	0,83
I148N	17	7	17	0	1	1	0,83
P5L	16	31	13	0	1	1	0,83
V232D	23	35	13	0	1	1	0,83
Total geral				98	22	120	100

FONTE: o autor

NOTA: nd - não definido (não foi possível estabelecer o alelo)
"/" - não foi possível identificar o alelo (indica "ou")

4.4.2 Frequência dos haplótipos formados pelos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/Ava II, IVS17bTA, e IVS17bCA

O apêndice 7 mostra a distribuição dos haplótipos formados pelos seis marcadores internos do gene CFTR em cromossomos de afetados.

4.4.3 Análise de Desequilíbrio de Ligação

A tabela 20 apresenta a análise de desequilíbrio de ligação entre as mutações encontradas no grupo euro-brasileiro e os haplótipos dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA. Valores não significativos foram encontrados apenas em alguns haplótipos associados à mutação $\Delta F508$.

TABELA 20. ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES CFTR E OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DO GRUPO EURO-BRASILEIRO

								continua
Mutação CFTR \ Microssatélites	n	Fho	Fhe	$\Delta_{\text{máx}}$	Δ	ΔR	P	
$\Delta F508 \setminus 16-7-17$	1	0,0099	0,0200	-0,0200	-0,0101	-0,5050	ns	
$\Delta F508 \setminus 16-29-14$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	ns	
$\Delta F508 \setminus 16-31-13$	1	0,0099	0,0150	-0,0150	-0,0051	-0,3400	ns	
$\Delta F508 \setminus 17-31/34-13$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	ns	
$\Delta F508 \setminus 17-30-13$	1	0,0099	0,0100	-0,0100	-0,0001	-0,0100	ns	
$\Delta F508 \setminus 17-31-13$	20	0,1980	0,1200	0,1176	0,0780	0,6630	$<1 \times 10^{-6}$	
$\Delta F508 \setminus 17-32-13$	7	0,0693	0,0350	0,0343	0,0343	1,0000	$<1 \times 10^{-4}$	
$\Delta F508 \setminus 23-31-13$	15	0,1485	0,0900	0,0882	0,0585	0,6630	$<2 \times 10^{-5}$	
$\Delta F508 \setminus 23-32-14$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	Ns	
$\Delta F508 \setminus 23-46-13$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	Ns	
$\Delta F508 \setminus 25-30-13$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	Ns	
$\Delta F508 \setminus 26-31-13$	1	0,0099	0,0050	0,0049	0,0049	1,0000	Ns	
G542X \ 23-32-13	1	0,0099	0,0007	0,0092	0,0092	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	
G542X \ 23-33-13	5	0,0495	0,0034	0,0461	0,0461	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	
G542X \ 23-34-13	1	0,0099	0,0007	0,0092	0,0092	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	
N1303K \ 23-30-13	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	
N1303K \ 23-31-13	3	0,0297	0,0071	0,0325	0,0226	0,6960	$<2 \times 10^{-5}$	
G85E \ 16-24-13	4	0,0396	0,0016	0,0380	0,0380	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	
R1162X \ 17-31-13	4	0,0396	0,0094	0,0302	0,0302	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$	

							conclusão
Mutação CFTR \ Microssatélites	n	Fho	Fhe	$\Delta_{\text{máx}}$	Δ	ΔR	P
R334W \ 16-34-13	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R334W \ 16-48-13	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R334W \ 17-33-13	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R334W \ 17-41-13	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
W1282X \ 17-7-17	3	0,0297	0,0018	0,0279	0,0279	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
2183AA:G \ 16-31-13	2	0,0198	0,0009	0,0288	0,0189	0,6560	$<1 \times 10^{-6}$
2183AA:G \ 16-31-14	1	0,0099	0,0006	0,0192	0,0093	0,4850	$<1 \times 10^{-6}$
A561E \ 16-44-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R553X \ 17-44-11	1	0,0099	0,0002	0,0097	0,0097	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R553X \ 17-47-11	1	0,0099	0,0002	0,0097	0,0097	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
Y1092X \ 16-30-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
1717-1G:A \ 16-7-17	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
1717-8G:A \ 16-33-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
1812-1G:A \ 16-31-14	1	0,0099	0,0002	0,0097	0,0097	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
1898-1G:A \ 16-45-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
232del18 \ 21-36-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
3849+10kbC:T \ 16-7-17	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
621+1G:T \ 18-34-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
711+5G:A \ 16-7-17	1	0,0099	0,0004	0,0095	0,0095	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
711+1G:T \ 16-25-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
E585X \ 16-21-19	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
G1069R \ 17-30-13	1	0,0099	0,0002	0,0097	0,0097	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R347P \ 16-32-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
S4X \ 16-nd-13	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
W1282G \ 16-32-14	1	0,0099	0,0001	0,0098	0,0098	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$

FONTE: o autor

NOTA: n=número de cromossomos; Fho=frequência haplotípica observada; Fhe= frequência haplotípica esperada; $\Delta_{\text{máx}}$ =desequilíbrio de ligação máximo; Δ = desequilíbrio de ligação; ΔR = desequilíbrio de ligação relativo; ns=não significativo; “/” - não foi possível identificar o alelo (indica “ou”)

A tabela 21 apresenta a análise de desequilíbrio de ligação entre as mutações encontradas no grupo afro-brasileiro e os haplótipos dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA. Todos os valores encontrados foram estatisticamente significantes.

TABELA 21. ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES CFTR E OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DO GRUPO AFRO-BRASILEIRO

Mutação CFTR \ Microssatélites	n	Fho	Fhe	$\Delta_{\text{máx}}$	Δ	ΔR	P
$\Delta F508 \setminus 17-31-13$	1	0,0455	0,0124	0,0331	0,0331	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
$\Delta F508 \setminus 16/23-33-13$	1	0,0455	0,0124	0,0331	0,0331	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
$\Delta F508 \setminus 23-31-13$	3	0,1364	0,0496	0,1322	0,0868	0,6560	$<1 \times 10^{-6}$
$\Delta F508 \setminus 25-31-13$	1	0,0455	0,0124	0,0331	0,0331	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
N1303K \ 23-31-13	1	0,0455	0,0083	0,0372	0,0372	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
3120+1G:A \ 17-7-17	3	0,1364	0,0248	0,1116	0,1116	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
A561E \ 16-42-13	1	0,0455	0,0041	0,0413	0,0413	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
A561E \ 16-45-13	1	0,0455	0,0041	0,0413	0,0413	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
Q552K \ 16-28-16	2	0,0909	0,0083	0,0826	0,0826	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
R1066C \ 16-33-13	2	0,0909	0,0083	0,0826	0,0826	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
Y1092X \ 16-31-13	1	0,0455	0,0062	0,0393	0,0393	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
565del C \ 16-31-13	1	0,0455	0,0062	0,0393	0,0393	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
E504X \ 16-31-14	1	0,0455	0,0021	0,0434	0,0434	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
I148N \ 17-7-17	1	0,0455	0,0083	0,0372	0,0372	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
P5L \ 16-31-13	1	0,0455	0,0062	0,0393	0,0393	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$
V232D \ 23-35-13	1	0,0455	0,0021	0,0434	0,0434	1,0000	$<1 \times 10^{-6}$

FONTE: o autor

NOTA: n=número de cromossomos; Fho=freqüência haplotípica observada; Fhe= freqüência haplotípica esperada; $\Delta_{\text{máx}}$ =desequilíbrio de ligação máximo; Δ = desequilíbrio de ligação; ΔR = desequilíbrio de ligação relativo; “/” - não foi possível identificar o alelo (indica “ou”)

4.5 Identificação de Mutação Meiótica no Microssatélite IVS17bTA.

Foi identificado em um indivíduo, pertencente ao grupo euro-brasileiro, nascido no estado do Paraná, uma mutação de origem paterna no marcador IVS17bTA³ O pai apresenta para este marcador os alelos 31/44, a mãe apresenta os alelos 32/55 e a criança os alelos 32/46. O gameta paterno, que fecundou o gameta materno, apresentou

³ A confirmação de paternidade da amostra foi gentilmente realizada pelo Centro de Aconselhamento e laboratório de Genética – GENETIKA, sendo que foi comprovada a paternidade com confiabilidade superior a 99,9999%

uma alteração de ganho de repetições. Neste caso foi o ganho de duas repetições no microsatélite IVS17bTA, passando de 44 repetições para 46.

5 DISCUSSÃO

Desde a identificação do gene responsável pela FC e a identificação da $\Delta F508$, sua mutação mais freqüente, mais de 1150 variações na seqüência do gene CFTR foram detectadas e mais de 894 destas alterações são prováveis mutações causadoras do fenótipo FC (CFGAC, 1999). Incluindo a mutação $\Delta F508$, a qual corresponde á 66,80% de todos os cromossomos FC identificados (ESTIVILL e cols., 1997), variando de 87,50% na Dinamarca até 24,50% na Turquia, as freqüências para mutações FC específicas apresentam ampla variação geográfica, étnica e entre diferentes populações (CFGAC, 1994; ESTIVILL e cols., 1997; ONAY e cols., 2001; BOBADILLA e cols., 2002).

No Brasil, país que recebeu grande número de imigrantes europeus e, portanto conta com grande contingente de seus descendentes, pouco se sabe sobre a real incidência dessa doença, suas características epidemiológicas e peculiaridades do ponto de vista da genética de nossa população. A isto se soma o contingente de descendentes africanos, grupo continental com uma quantidade bastante reduzida de trabalhos relacionados às bases moleculares da fibrose cística, sendo esta uma população importante na formação da base genética da população brasileira.

Cada vez mais urge a necessidade de um melhor conhecimento das bases moleculares desta doença, que em outros países já está em fase bastante avançada, a fim de que possamos melhorar a qualidade de vida de nossos pacientes, objetivo que já foi alcançado em países do primeiro mundo.

Com esta finalidade este trabalho procurou fornecer mais subsídios para que a população brasileira fique um pouco mais bem conhecida com relação às bases moleculares do gene CFTR.

5.1 Freqüências Alélicas e Haplotípicas dos Marcadores Intra-Gênicos de CFTR

Os seis polimorfismos na região do gene CFTR considerados no presente trabalho, têm sido amplamente descritos em cromossomos FC. Porém, a maioria dos estudos existentes sobre marcadores e haplótipos em genética clínica são baseados em populações européias (por exemplo HUGHES e cols., 1995; 1996; MORRAL e cols., 1996; CLAUSTRES e cols., 1996). O estudo em nossa população apresentou importantes diferenças com relação às freqüências alélicas e haplotípicas, quando os dois grupos continentais foram analisados.

5.1.1 Marcadores IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/*Ava* II

Observou-se que, com relação aos marcadores IVS6aGATT, IVS8-T(n), T854/*Ava* II havia uma diferença bastante acentuada entre as freqüências observadas quando os dois grupos de afetados eram comparados. Esta diferença foi comprovada estatisticamente para os marcadores IVS6aGATT e T854/*Ava* II, com valores de p menores que 0,01 e 0,001, respectivamente. Porém para estes marcadores o número total de cromossomos analisados entre o grupo afro-brasileiro foi bastante reduzido, principalmente para o marcador IVS6aGATT, onde foram analisados apenas cinco indivíduos. Isto se deveu ao fato de que a quantidade de amostra existente era pequena, sendo que foi dada prioridade para outras análises. Apesar do número pequeno analisado no grupo afro-brasileiro, o marcador IVS6aGATT parece dar indício de que há uma diferença bastante acentuada com relação a freqüência relativa de seus alelos, quando comparada com o grupo euro-brasileiro. Isto pode ser identificado pela observação de que a freqüência do alelo 6, tanto no grupo euro-brasileiro afetado (38,89%), quanto na população geral de descendência européia (28,47% - MORRAL e cols., 1996; MATEU e cols., 2001) é inferior a do alelo 7, sendo que na amostra

analisada, apesar do pequeno número, apenas o alelo 6 foi encontrado, indicando que a sua frequência deve ser maior do que a do alelo 7.

Com relação ao marcador IVS8-T(n) uma observação interessante é de que o alelo IVS8-5T está ausente na amostra de afetados analisada, estando presente na amostra de cromossomos normais de origem euro-brasileira com uma frequência de 3,90% (vide tabela 9). A frequência encontrada em indivíduos normais está de acordo com o descrito para outras populações de origem européia (KIESEWETTER e cols., 1993; CHILLÓN e cols., 1995; JARVI e cols., 1995; PIGNATTI e cols., 1996)

5.1.2 Marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA

As frequências alélicas encontradas para os microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA em cromossomos normais, para o grupo continental euro-brasileiro, ficaram dentro do observado em outras populações (MORRAL e cols., 1993a; RUSSO e cols., 1995; BRAEKELLER e cols., 1996; MORRAL e cols., 1996; VISICH e cols., 2001; MATEU e cols., 2001).

As frequências destes STRs em cromossomos afetados não deve ser comparada com a descrita para outras populações, pois estas frequências estão sujeitas a frequências específicas das mutações nas populações. Dado o fato de que as mutações apresentam desequilíbrio de ligação com alelos específicos de microssatélites específicos e que a frequência das mutações existentes em diferentes populações varia bastante, estaria sendo inserido um erro de averiguação importante se esta comparação fosse realizada, comprometendo os resultados.

Análises que podem nos fornecer informações importantes são comparações entre cromossomos mutados e cromossomos normais dentro de um mesmo grupo continental e, também, comparações entre cromossomos mutados e entre cromossomos normais dentro de grupos continentais distintos.

Quando os cromossomos mutados de diferentes grupos continentais foram analisados (tab. 10) as frequências alélicas dos marcadores IVS8CA e IVS17bCA mostraram diferenças significativas, enquanto que quando os cromossomos normais de

diferentes grupos continentais foram analisados (tab. 11), pôde-se observar que apenas as freqüências alélicas do marcador IVS17bCA se mostraram estatisticamente significante, com um valor de p menor que 0,01. Como o marcador IVS17bTA não apresentou diferença estatística entre os cromossomos mutados e entre os cromossomos normais de diferentes grupos continentais, indicando que podem ser unidos em uma única amostra, fez-se uma análise conjunta, unindo-se cromossomos mutados e normais dos dois grupos. O resultado obtido a partir desta análise foi estatisticamente significante, mostrando que há diferença entre cromossomos afetados e normais quando o marcador IVS17bTA é analisado.

Analisando-se os alelos de cromossomos afetados e normais presentes em um mesmo grupo continental observou-se que os resultados se mostraram estatisticamente significante para os três marcadores quando o grupo euro-brasileiro foi analisado (vide tab. 13), porém não se mostrou significante para nenhum dos alelos dos STRs do grupo afro-brasileiro quando estes mesmos parâmetros foram avaliados (tab. 14), o que pode refletir apenas um problema do tamanho amostral deste segundo grupo.

A análise de microssatélites intra-gênicos de CFTR mostrou-se bastante informativa na identificação de mutações presentes em cromossomos mutados. Excetuando-se a mutação $\Delta F508$ (que por ser a mais freqüente, merece análise direta), a simples caracterização destes dois microssatélites nos cromossomos mutados permitiria a inferência direta de outras mutações. Por exemplo, a identificação da presença do alelo 23 em IVS8CA sugere a análise direta das mutações G542X e N1303K por estar associado apenas a elas, sendo que, na amostra analisada, 23,40% das mutações não- $\Delta F508$ seriam caracterizadas com este procedimento. Outros exemplos podem ser observados, como a presença do alelo 24 em IVS17bTA, sugerindo análise direta da mutação G85E (apresentando associação absoluta e presente em 8,51% dos cromossomos não portadores da mutação $\Delta F508$); alelo 11 em IVS17bCA, em associação absoluta com a mutação R553X, presente em 4,26% dos cromossomos não portadores da mutação $\Delta F508$; alelo 31 em IVS17bTA, sugerindo análise direta das mutações R1162X e 2183 AA:G (representando 14,89% das mutações não- $\Delta F508$) ou da mutação 1812-1G:A; alelos 41 a 48 em IVS17bTA,

presente em cromossomos que continham as mutações R334W, A561E, R553X e 1898-1G:A, sendo que estas mutações correspondiam a 12,77% das mutações não- Δ F508. Com a observação dos exemplos supra-citados, a caracterização de 61,70% das mutações não- Δ F508 presentes na amostra seria bastante facilitada, demonstrando que a análise haplotípica destes marcadores pode ser usada como método de rastreamento de mutações, visto a heterogeneidade alélica e o tamanho do gene CFTR.

5.1.3 Haplótipos dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA

Em análise dos haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA verificamos que a somatória dos três haplótipos mais frequentes entre os cromossomos afetados do grupo euro-brasileiro totaliza 43,75%, enquanto que a somatória dos mesmos haplótipos entre os cromossomos normais deste mesmo grupo perfaz um total de apenas 3,77%, mostrando a alta associação existente entre estes haplótipos e mutações geradoras do fenótipo FC.

Análise com os microssatélites IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA no grupo euro-brasileiro (quando são comparados os haplótipos encontrados em cromossomos normais com os haplótipos associados a mutações nos cromossomos mutados) mostrou que os haplótipos mais comuns têm também o maior número de mutações associadas. Por exemplo o haplótipo 16-7-17 (12,26% entre os cromossomos normais) apresentou quatro mutações associadas, que foi o maior número encontrado. Outros haplótipos que eram menos comuns em cromossomos normais (16-34-13, 17-32-13, 17-47-11, 23-30-13) estavam associados a apenas uma mutação FC. Isto também pode ser observado para o grupo afro-brasileiro, onde o haplótipo 23-31-13 (6,25% entre os cromossomos normais) apresentou duas mutações associadas.

Muitas mutações estavam associadas com mais de um haplótipo, levando-se em conta os dois grupos analisados, aparentemente como resultado de um

deslizamento⁴ em um dos microssatélites IVS8CA, IVS17bTA ou IVS17bCA: Δ F508, G542X, 2183 AA:G, A561E, R553X e R334W (tab. 17). O deslizamento em um microssatélite pode ser relacionado a uma idade mais antiga desta mutação quando comparada com aquelas associadas a haplótipos únicos. Entretanto, deve ser levado em conta que alguns alelos podem ser mais estáveis que outros, dependendo do comprimento da região de repetição. Por exemplo, a mutação R553X estava associada a dois haplótipos (17-44-11 e 17-47-11), originados por deslizamento do loco IVS17bTA com ganho de três repetições. A mutação ocorreu em um cromossomo carregando o alelo 44, o qual é, provavelmente, mais instável e pode sofrer mutação mais facilmente que alelos com um número menor de repetições.

As mutações Δ F508, G542X, e R334W estavam associadas com vários haplótipos de microssatélites, como resultado de deslizamento em um dos três microssatélites, dando um suporte adicional para uma origem mais antiga destas mutações (MORRAL e cols., 1993a; 1994). Uma outra observação é que a diversidade de haplótipos associados à mutação Δ F508 não pode ser explicada apenas por deslizamento de microssatélites. No caso desta mutação, uma origem independente deve ser postulada, como já sugerido por MORRAL e cols. (1993a).

Como foi observado na análise de alelos específicos presentes nos microssatélites (vide item 5.1.2), a análise dos haplótipos formados pelos três STRs também auxiliam na caracterização de mutações. Por exemplo, a presença do alelo 23 em IVS8CA e do alelo 31 em IVS17bTA em um mesmo cromossomo formando o haplótipo 23-31 (presente no haplótipo 23-31-13, quando os STRs IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA são considerados) sugerem a análise direta apenas da mutação N1303K, pois este haplótipo apresenta associação absoluta com esta mutação. O mesmo é observado em outras situações como a associação do haplótipo 17-31, para IVS8CA e IVS17bTA respectivamente (presente no haplótipo 17-31-13), com a mutação R1162X; a associação do haplótipo 17-11, para IVS8CA e IVS17bCA

⁴ O termo deslizamento será utilizado para indicar uma falha durante o processo de replicação. Esta falha normalmente gera um aumento no número de repetições em um dado microssatélite.

respectivamente (presente nos haplótipos 17-44-11 e 17-47-11), com a mutação R553X; entre outras.

5.2 Identificação de Mutações em CFTR

A complexidade do gene CFTR (27 éxons que codificam para um RNAm de 6,1 kb) e o grande número de cromossomos analisados (474 cromossomos dos indivíduos de 79 famílias) dificultou a caracterização de todas as mutações na população, pois houve a necessidade de uma utilização bastante criteriosa de recursos e de tempo. Por exemplo, para a caracterização da variabilidade existente nos cromossomos dos 56 afetados do grupo euro-brasileiro foram realizadas mais de 2.300 PCRs.

A metodologia de análise de mutações evoluiu consideravelmente, permitindo atualmente a detecção de 80 a 99% das mutações presentes em um fragmento de DNA. Quando foi iniciada a análise do gene CFTR para a realização deste trabalho as técnicas que apresentavam uma maior porcentagem de detecção de mutações eram DGGE e SSCA. O principal sistema usado foi o SSCA, devido a sua simplicidade e ao fato de não necessitar nenhum equipamento especial. Desde que foi iniciada a utilização desta metodologia algumas alterações foram realizadas, principalmente com relação às condições de eletroforese, o que permitiu aumentar o seu nível de detecção para mais de 90%, e com relação a sua visualização, cuja metodologia padronizada era a marcação radioativa e visualização com chapa de raios-X, que foi alterada para coloração com prata. Mesmo tendo-se descrito numerosas condições de eletroforese para se conseguir detectar o maior número de alterações por SSCA, o grande número de experimentos realizados durante a presente tese, indicou que as melhores condições foram as de eletroforese em géis de acrilamida a 12% (relação acrilamida:bisacrilamida de 39:1), realizadas a 4°C, com a voltagem limitada a 1500V e sem a adição de nenhuma substância (glicerol, sacarose ou dimetilsulfóxido). Nas condições anteriormente descritas, o tempo de migração, em horas, de um determinado

fragmento seguiu a relação: nº de nucleotídeos / 10. Com relação à técnica DGGE não foi possível realizar grandes alterações na metodologia já padronizada.

5.2.1 Mutações em Pacientes Euro-Brasileiros

A amostra mais freqüente encontrada neste grupo foi a $\Delta F508$ com uma freqüência de 45,54% entre os 112 cromossomos analisados. Este valor está bastante próximo do valor estimado a partir de recentes trabalhos publicados na literatura (RASKIN e cols., 1997b; CABELLO e cols., 1999; BERNARDINO e cols., 2000; BOBADILLA e cols., 2002), que colocam a freqüência da mutação $\Delta F508$ na população brasileira em 47,70%. Porém, é muito importante ressaltar que esta freqüência foi levantada a partir de afetados de descendência predominantemente européia, pois estes trabalhos tiveram como área de estudo principalmente a região Sul e Sudeste do Brasil, regiões onde a influência européia é maior. Como o componente africano é bastante importante na composição do perfil genético da população brasileira, em uma análise mais ampla a freqüência desta mutação deve diminuir.

Por outro lado, o Brasil é um país extremamente heterogêneo, apresentando um gradiente crescente de componente genético de origem africana no sentido Sul – Norte do país (SALZANO; FREIRE-MAIA, 1967), o que coloca em xeque a eficiência de se estimar uma freqüência geral na população brasileira. Como existe uma diferença grande na composição genética de grupos populacionais (por exemplo, região Sul predominantemente formada por ascendência européia e região Nordeste formada por ascendência predominantemente africana) o ideal é que sejam construídos painéis de mutações no gene CFTR regionalizados, a fim de que se possa ter uma real noção de quais mutações estão presentes em determinado estado.

A freqüência encontrada no presente trabalho para a mutação $\Delta F508$ está bastante próxima daquela identificada em países do sul da Europa como, por exemplo, Espanha, com 52,70% (CASALS e cols., 1997; ESTIVILL e cols., 1997), Portugal, com 44,70% (CFGAC, 1994; ESTIVILL e cols., 1997), e Itália, com 50,90% (ESTIVILL e cols., 1997), corroborando a hipótese de a população Européia

(principalmente países mediterrâneos) ser importante na composição genética da população brasileira.

A segunda mutação mais freqüente foi a G542X, com uma freqüência de 6,25%. Esta mutação é considerada como a segunda mais freqüente na população européia com uma freqüência estimada de 2,40% (ESTIVILL e cols., 1997). Ela também apresentou uma freqüência bastante próxima a encontrada para a população brasileira, que é de 8,30% (RASKIN e cols., 1999; CABELLO e cols., 1999; BERNARDINO e cols., 2000; BOBADILLA e cols., 2002) e para a população de alguns países da América Latina como Colômbia (6,30%), Argentina (3,90%) e México (5,60%) (PAZ-Y-MINO e cols., 1999; CHERTKOFF e cols., 1997; OROZKO e cols., 2000). Como ocorre com a $\Delta F508$, podemos verificar freqüência semelhante em alguns países do sul da Europa, como Espanha, com 8,00% (CASALS e cols., 1997; ESTIVILL e cols., 1997), sul da Itália, com 5,70% (CASTALDO e cols., 1999), e sul da França, com 6,40% (CLAUSTRES e cols., 1993).

Entre o grupo euro-brasileiro, quatro mutações apresentaram freqüência de 3,57%. Estas foram: N1303K, R334W, R1162X e G85E. Na análise das freqüências destas mutações levantadas por outros autores, vemos que as freqüências não se distanciam muito. Segundo RASKIN e cols. (1999); CABELLO e cols., (1999); BERNARDINO e cols., (2000); e BOBADILLA e cols. (2002), as freqüências destas mutações na população Brasileira seriam de 2,40%, 2,50%, 2,50%, e 1,30%, respectivamente, ficando bastante próximas das freqüências estimadas na amostra analisada.

5.2.1.1 *Outras Mutações em CFTR*

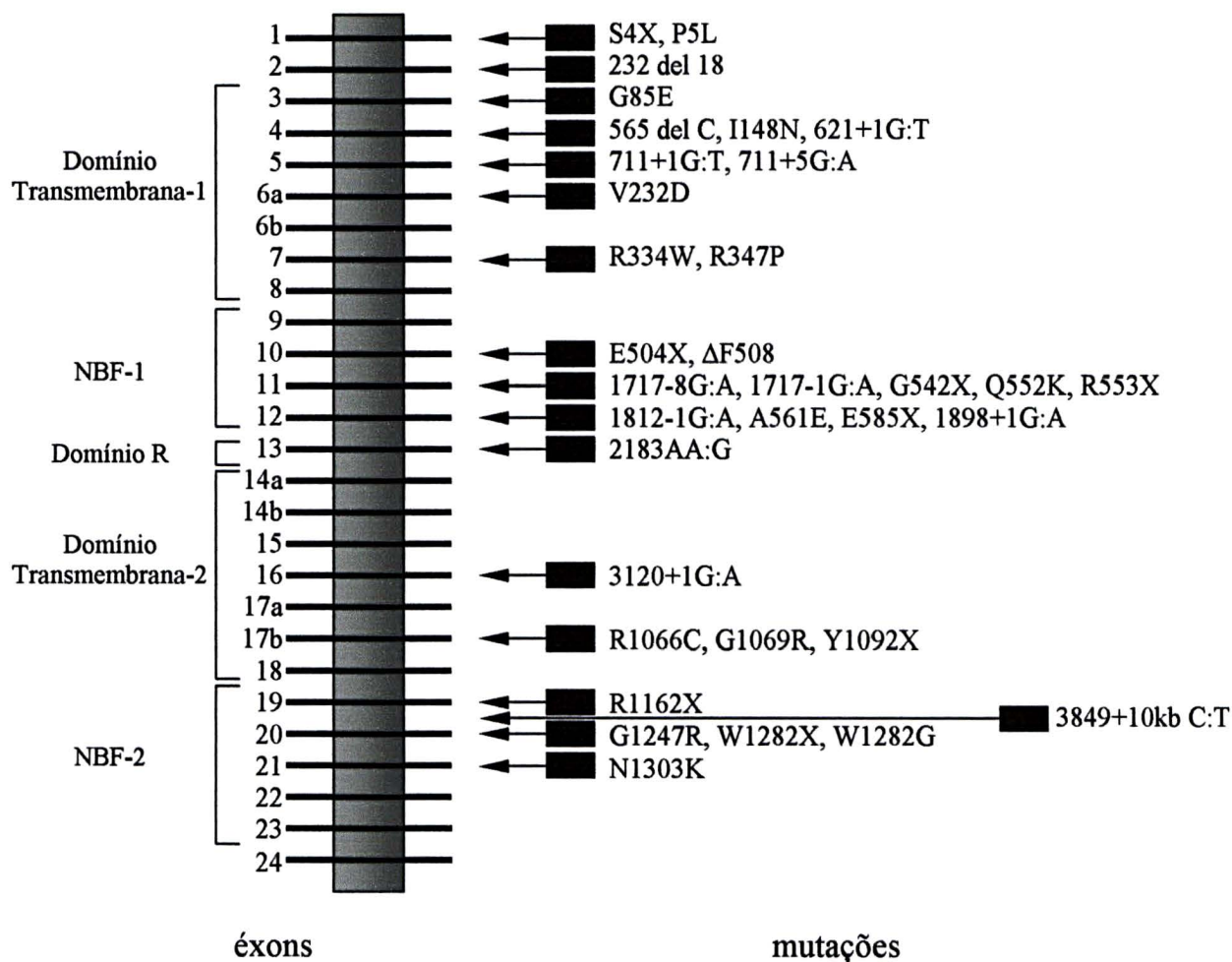
Excetuando-se as mutações já apresentadas foram identificadas mais 19 mutações no grupo euro-brasileiro (vide tab. 18). Destas a mutação R553X apresenta uma característica especial. Diferentemente das mutações anteriormente descritas, esta mutação (que neste estudo apresentou uma freqüência de 1,79%) apresenta-se em baixas freqüências tanto na Europa como um todo (0,75% - ESTIVILL e cols., 1997)

quanto nos países do sul da Europa [Sul da Itália – 0,80% (CASTALDO e cols., 1999); Portugal – não detectada (ESTIVILL e cols., 1997); Espanha – 0,35% (ESTIVILL e cols., 1997)], porém esta mutação apresenta uma frequência de 2,00% na Alemanha, que é um dos grandes países doadores de material genético para a composição da população brasileira, comprovando a grande heterogeneidade existente em nossa população.

A identificação das distintas mutações responsáveis por FC permitiu concluir a análise direta da doença em 92,86% das famílias do grupo continental euro-brasileiro e em 69,57% das famílias do grupo continental afro-brasileiro. No primeiro grupo apenas em 7,14% dos afetados não se pôde identificar nenhuma mutação, já no segundo grupo este número chegou a 30,43%. Apesar deste alto índice de detecção no grupo euro-brasileiro, a heterogeneidade genética existente na população brasileira, o elevado número de mutações (34 entre os dois grupos continentais) e a sua distribuição em 16 éxons do gene CFTR (fig. 11), dificultam o diagnóstico molecular da doença, devido ao elevado número de análises necessárias para caracterizar cada caso de FC.

O número das mutações caracterizadas depende diretamente do grau de heterogeneidade genética de cada população em particular. Esta heterogeneidade está diretamente relacionada ao grau de isolamento desta população (isto é, do intercâmbio genético com outras populações, de modo que as características genéticas próprias se diluam em um maior ou menor grau). Graças ao intercâmbio genético que a população brasileira sofreu nos últimos 150 anos (estima-se que neste período o Brasil tenha recebido mais de 5 milhões de imigrantes de diferentes nacionalidades, que se assentaram principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), ela apresenta uma elevada heterogeneidade genética. Esta alta heterogeneidade já havia sido observada por RASKIN e cols. (1999) e foi corroborada pela identificação, neste trabalho, de um grande número de mutações (25) conferindo uma taxa de detecção 87,50%, em contraste com outras populações, onde um número

FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO DAS MUTAÇÕES DETECTADAS NO GENE CFTR NA POPULAÇÃO BRASILEIRA



menor de mutações conferem uma taxa bem mais elevada de detecção [Judeus Ashkenazi – Israel, com cinco mutações correspondendo a 97% de detecção (ABELIOVICH e cols., 1992), País de Gales, com 17 mutações correspondendo a 99% de detecção (CHADLE e cols., 1993), Bélgica, com 17 mutações correspondendo a 97% de detecção (CUPPENS e cols., 1993)].

5.2.1.2 Identificação de Duas Mutações Novas e Um Polimorfismo

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram identificadas duas novas mutações e um novo polimorfismo no grupo euro-brasileiro:

- 232 del 18: Mutação localizada no éxon 2. É resultante de uma deleção de 18 pb com a consequente perda de seis aminoácidos. Estende-se desde a Leucina na posição 34 até a Glicina na posição 39. Esta mutação foi identificada em um indivíduo com insuficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica SSCA e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC⁵ (2003).
- W1282G: Mutação localizada no éxon 20. É formada a partir de uma alteração no nucleotídeo 3976 onde uma timina é substituída por uma guanina, fazendo com que haja uma alteração do aminoácido Triptofano para uma Glicina no códon 1282. Esta mutação foi identificada em um indivíduo com insuficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica DGGE e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).
- 1716+85C/T: Polimorfismo localizado no íntron 10. É uma alteração de uma citosina por uma timina 85 pb após o término do éxon 10. Em princípio não deve ser responsável por nenhuma alteração fenotípica no indivíduo, pois não está localizada em região codificadora. Foi

⁵ Newsletter 69: Jornal eletrônico presente no site do Consórcio de Análise Genética da Fibrose Cística (CFGAC – <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>) utilizado para simples relato das mutações encontradas por grupos que analisam o gene CFTR.

detectado por SSCA e posteriormente foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificado o polimorfismo. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).

5.2.2 Mutações em Afro-Brasileiros

Na amostra afro-brasileira, como já era esperado, o resultado obtido foi bastante distinto daquele observado entre os euro-brasileiros. A mutação mais freqüente foi, igualmente, a $\Delta F508$, porém com uma freqüência de 15,22%, bastante inferior àquela encontrada em euro-brasileiros (45,54%). Os trabalhos existentes em populações de origem africana são bastante escassos e, em média, mostram freqüências bem maiores desta mutação nas populações analisadas. Em quatro regiões geográficas distintas dos EUA, tem-se: 37% de 54 cromossomos em afro-americanos de Maryland (CUTTING e cols., 1990), 50% de 28 cromossomos em afro-americanos do Tennessee e Alabama (OBER e cols., 1992), 25% de 28 cromossomos em afro-americanos da área de Chicago (PHILLIPS e cols., 1995) e 48% de 164 cromossomos em afro-americanos de diversas regiões dos EUA (MACEK e cols., 1997). De posse destes dados, algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar a baixa freqüência encontrada.

A primeira hipótese que poderia explicar esta diferença poderia ser uma alta taxa de miscigenação nas análises de afro-americanos. Outra hipótese poderia ser uma origem distinta dos ascendentes que migraram para os EUA com relação aos que migraram para o Brasil. Uma terceira hipótese seria um viés de investigação no critério de inclusão dos afro-brasileiros na amostra, pois se os afetados mais graves de FC tivessem ido a óbito antes de serem averiguados, isto poderia gerar um decréscimo de homozigotos para a mutação $\Delta F508$ (genótipo associado aos fenótipos graves), com conseqüente redução da freqüência desta mutação (RASKIN, 2001). Uma quarta hipótese poderia ser uma falha na averiguação, onde pacientes com doenças diferentes da FC estariam entrando na amostra (visto a taxa de 30,43% de indivíduos que não apresentaram nenhuma mutação identificada). Uma quinta hipótese pode ser a

presença de uma mutação nova, e não identificada no presente estudo, e que por deriva genética na população de afro-brasileiros do estado de MG atingiu uma frequência bastante alta, diminuindo a frequência da $\Delta F508$. Uma sexta hipótese pode ser a presença de várias mutações novas e não identificadas neste trabalho, o que também diminuiria a frequência da $\Delta F508$.

Para explicar as diferenças encontradas entre afro-brasileiros e afro-americanos todas as hipóteses podem ser levadas em conta, sendo que a presença de uma mutação nova, acompanhada de deriva genética na amostra analisada é a que se mostra menos plausível, visto que os haplótipos existentes nos cromossomos que não tiveram mutação identificada são bastante distintos. Em contrapartida a terceira hipótese de falha na averiguação pode ser mais plausível, visto a alta taxa de indivíduos que não apresentaram nenhuma mutação identificada (30,43%). Neste caso, os critérios de inclusão de indivíduos de ascendência africana deveriam ser revistos pelos médicos brasileiros.

A segunda mutação mais freqüente entre os afro-brasileiros foi a 3120+1G:A, com uma frequência de 6,52%. Esta mutação já foi identificada em outras populações de origem africana (CARLES e cols., 1996; MACEK e cols., 1997; PADOA, e cols., 1999), se apresentando com frequências bastante elevadas. PADOA e cols. (1999), estimaram que esta mutação estaria presente entre 15 e 65% dos cromossomos FC na população negra Sul Africana.

5.2.2.1 *Outras Mutações em CFTR*

Além das mutações $\Delta F508$ e 3120+1G:A foram encontradas outras 11 mutações no grupo afro-brasileiro. Destas, duas estavam em homozigose [G1247R - presente em um indivíduo com consangüinidade relatada (pais primos em terceiro grau) - e Q552K - presente em um indivíduo sem consangüinidade relatada] e outras duas (A561E e R1066C) estavam, cada uma, presentes em dois indivíduos não aparentados, sendo que estas quatro mutações se apresentaram com frequência de 4,35%. Nenhuma destas quatro mutações havia sido previamente descrita em

populações de ascendência africana. Outras sete mutações foram identificadas, estando presentes em apenas um cromossomos cada uma. Eram elas: N1303K, Y1092X, P5L, 565 del C, I148N, V232D, E504X. Este tipo de distribuição de mutações só ocorre em países como o Brasil, com altas taxas de miscigenação, tendo alelos típicos de descendentes europeus presentes em afro-brasileiros, como é o caso da mutação N1303K.

5.2.2.2 *Identificação de Cinco Mutações Novas*

Cinco mutações novas foram identificadas na amostra de afro-brasileiros, sendo que estas mutações apresentaram-se com frequência de 31,82%, quando apenas cromossomos mutados são observados. Isto mostra o quão desconhecido é o aspecto molecular do gene CFTR em populações de origem africana.

As mutações encontradas foram:

- 565 del C: Mutação localizada no éxon 4. É resultante de uma deleção de uma citosina na posição 565. Esta alteração causa uma alteração no quadro de leitura a partir do par de nucleotídeo deletado, sendo conhecida por *frameshift*. De maneira geral, este tipo de mutação tem um efeito fenotípico mais severo quanto maior for a proximidade da mutação do início do gene. Isto foi identificado no paciente, que apresenta insuficiência pancreática e insuficiência pulmonar. Ela foi identificada pela técnica SSCA e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).
- I148N: Mutação localizada no éxon 4. É formada a partir de uma alteração no nucleotídeo 575 onde uma timina é substituída por uma adenina, fazendo com que haja uma alteração do aminoácido Isoleucina para uma Asparagina no códon 148. Esta mutação foi identificada em um indivíduo com suficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica

SSCA e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).

- E504X: Mutação localizada no éxon 10. É formada a partir de uma alteração no nucleotídeo 1642 onde uma guanina é substituída por uma timina, fazendo com que haja uma alteração do aminoácido Triptofano para um códon de terminação na posição 504. Esta mutação foi identificada em um indivíduo com insuficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica SSCA e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).
- Q552K: Mutação localizada no éxon 11. É formada a partir de uma alteração no nucleotídeo 1786 onde uma citosina é substituída por uma adenina, fazendo com que haja uma alteração do aminoácido Glicina para uma Lisina no códon 552. Esta mutação foi identificada em homozigose em um indivíduo com insuficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica DGGE e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).
- G1247R: Mutação localizada no éxon 20. É formada a partir de uma alteração no nucleotídeo 3871 onde uma guanina é substituída por uma adenina, fazendo com que haja uma alteração do aminoácido Glicina para uma argenina no códon 1247. Esta mutação foi identificada em homozigose em um indivíduo com insuficiência pancreática e problema pulmonar moderado. Um padrão anômalo de banda foi identificado pela técnica DGGE e então foi feito o sequenciamento do produto de PCR que gerou o padrão anômalo, sendo então identificada a mutação. Ela foi publicada no Newsletter 69 do CFGAC (2003).

5.3 Considerações gerais sobre mutações não identificadas

O fato de não se ter conseguido caracterizar todas as mutações do gene CFTR, apesar de se ter feito o *rastreamento* de todos os éxons, pode ser devido ao fato de que podem existir mutações na região promotora ou dentro de íntrons (criando sítios de *splicing* alternativo), regiões do gene CFTR que não foram analisadas no presente trabalho. Uma outra possibilidade é a existência de grandes deleções, que não seriam detectadas nem por DGGE e nem por SSCA. Também se deve levar em conta o fato de que a capacidade de identificação destas duas técnicas de análise molecular não é de 100%. Deve-se também levar em conta o fato da possibilidade de existirem indivíduos erroneamente caracterizados como afetados por fibrose cística, devido a uma falha no diagnóstico (vide item 5.2.2). Isto seria plausível principalmente no grupo continental afro-brasileiro.

5.3.1 Frequências e haplótipos de mutações não identificadas neste estudo

Analisando-se os haplótipos formados pelos STRs IVS8CA, IVS17bTA e IVS17bCA (apêndice 8), pode-se observar que no grupo continental euro-brasileiro 14 haplótipos estavam presentes em cromossomos que não tiveram a mutação identificada. Para o grupo continental afro-brasileiro se dividiram em 21 haplótipos. Pela observação dos haplótipos pode ser notado que existe uma variabilidade bastante acentuada entre eles quando alelos de um mesmo microsatélite são observados, sendo que não existem haplótipos com uma alta frequência. Estas duas observações sugerem que não haja, entre estes haplótipos, apenas uma única mutação associada.

5.4 Análise de Desequilíbrio de Ligação

As análises do desequilíbrio de ligação existente entre as mutações em CFTR e os haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA são dificultadas devido ao elevado grau de desequilíbrio de ligação e ao pequeno tamanho amostral. Esta análise foi realizada simplesmente como um reforço de um fenômeno facilmente observável nos dados apresentados: pouca diversidade nos haplótipos com alelo mutado. Este fenômeno também foi observado em trabalhos que focaram a relação entre mutações em CFTR e associação com haplótipos formados por estes três STRs. Conseguiu-se, portanto, mostrar que as mesmas associações apresentadas por outros autores (MORRAL e cols., 1993a; RUSSO e cols., 1995; BRAEKELLER e cols., 1996; MORRAL e cols., 1996; VISICH e cols., 2001) foram observadas no presente trabalho, incluindo-se aí as associações existentes entre mutações em CFTR e haplótipos formados por estes três marcadores no grupo afro-brasileiro (apesar do pouco número de mutações presentes).

Um dado bastante interessante é o fato de que, até o momento, em populações de origem européia, a mutação G85E apresenta associação absoluta com o haplótipo 16-24-13 (presente em quatro cromossomos no presente trabalho e em outros 46 cromossomos em trabalhos diversos) Em análise de mais de 6.000 cromossomos normais este haplótipo ainda não havia sido descrito (ESTIVILL, comunicação pessoal), estando, portanto, a sua presença relacionada única e exclusivamente à mutação G85E. Neste trabalho um cromossomo normal, presente no grupo euro-brasileiro, apresentou este haplótipo, reforçando, ainda mais, a diferença existente entre os dois grupos continentais.

5.5 Detecção de Mutação no Microssatélite IVS17bTA

Durante o desenvolvimento do presente trabalho foi identificada uma mutação do tipo deslizamento (mutação que gera alteração no número de repetições em um dado microssatélite). Esta mutação ocorre durante o processo de divisão meiótica e acaba por gerar um aumento ou diminuição no número de repetições. Até o momento não foi descrita a verificação de nenhuma mutação deste tipo nos microssatélites existentes no gene CFTR (ESTIVILL, comunicação pessoal). MORRAL e cols. (1994) calcularam a idade aproximada da mutação $\Delta F508$ tendo como base a identificação do provável haplótipo original, onde surgiu esta mutação. A partir daí, estimaram o número de mutações existentes para a formação dos 46 haplótipos derivados do haplótipo ancestral 23-31-13 (sendo que foram desconsiderados para estes cálculos aqueles haplótipos cujos quais resultavam de eventos recombinatórios). Para esta análise foi estimado que a idade de surgimento da mutação $\Delta F508$ era de 52.000 anos, tomando como base para este cálculo o fato de que não havia sido observado nenhum alelo novo em nenhuma das 3.000 meioses observadas para os três microssatélites. Na análise das amostras desta tese foram observados 237 eventos meióticos para os microssatélites e um alelo novo foi encontrado. Isto sugere que o cálculo realizado para estimativa da idade da origem da mutação $\Delta F508$ deve ser revisto, tomando-se como base um maior número amostral.

6 CONCLUSÕES

- 1- Em relação às mutações em CFTR no grupo continental euro-brasileiro, a mutação mais freqüente encontrada foi a $\Delta F508$ com uma freqüência de 45,54% entre os 112 cromossomos analisados. A segunda mutação mais freqüente foi a G542X, com uma freqüência de 6,25%. Outras quatro mutações apresentaram freqüência de 3,57% (N1303K, R334W, R1162X e G85E) e outras 19 mutações (2183 AA:G, W1282X, A561E, R553X, Y1092X, 3849+10kb C:T, 711+5G:A, 621+1G:T, G1069R, W1282G, S4X, E585X, 1717-8G:A, 711+1G:T, 1812-1G:A, 1717-1G:A, 232 del 18, R347P, 1898-1G:A) foram encontradas no grupo euro-brasileiro com freqüências variando entre 0,89 e 2,65%;
- 2- Na caracterização das mutações existentes entre os afetados do grupo continental afro-brasileiro a mutação mais freqüente foi a $\Delta F508$ com uma freqüência de 15,22%, bastante inferior àquela encontrada em euro-brasileiros (45,54%). A segunda mutação mais freqüente entre os afro-brasileiros foi a 3120+1G:A, com uma freqüência de 6,52%. Quatro mutações (ainda não descritas em população de origem africana) se apresentaram com freqüência de 4,35% (G1247R, Q552K, A561E e R1066C). Outras sete mutações (N1303K, Y1092X, P5L, 565 del C, I148N, V232D, E504X) foram identificadas, estando presentes em apenas um cromossomo cada uma;
- 3- A identificação das distintas mutações responsáveis por FC permitiu concluir a análise molecular da doença em 92,86% das famílias do grupo continental euro-brasileiro e em 69,57% das famílias do grupo continental afro-brasileiro. No primeiro grupo apenas em 7,14% dos

afetados não se pôde identificar nenhuma mutação, já no segundo grupo este número chegou a 30,43%;

- 4- Em relação aos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA, os alelos mais freqüentes foram 7, 17, 9, 1, 31, 13 respectivamente para os cromossomos mutados no grupo continental euro-brasileiro e 6, 16, 7, 2, 31, 13 respectivamente para os cromossomos mutados no grupo continental afro-brasileiro. Entre os cromossomos normais os marcadores IVS8CA, IVS8-T(n), IVS17bTA, e IVS17bCA apresentaram, respectivamente, como alelos mais freqüentes, os alelos 16, 7, 7, 13 entre o grupo continental euro-brasileiro e 16, 7, 7, 13 entre o grupo continental afro-brasileiro;
- 5- Na análise dos haplótipos formados pelos marcadores IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/*Ava II*, IVS17bTA, e IVS17bCA em cromossomos mutados observou-se que o haplótipo mais freqüente nos dois grupos analisados foi o 6-23-9-1-31-13, com uma freqüência de 25,40% no grupo euro-brasileiro e uma freqüência de 75% no grupo afro-brasileiro;
- 6- Em relação aos haplótipos formados pelos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA, entre o grupo euro-brasileiro, os mais freqüentes foram o 17-31-13 (cromossomos mutados) e o 16-7-17 (cromossomos normais). Entre o grupo afro-brasileiro, os mais freqüentes foram o 23-31-13 (cromossomos mutados) e os 16-7-17, 16-30-13 e 16-32-13 (cromossomos normais);
- 7- Até o momento não se conhece nenhum trabalho que apresente uma análise de marcadores internos do gene CFTR em população de ascendência africana. Pelos dados fornecidos por este trabalho percebe-se que, em um primeiro momento, podemos caracterizar o grupo de origem africana analisado como apresentando diferenças importantes com relação a estes marcadores, sendo que maiores análises são necessárias;

- 8- O conjunto de mutações FC no grupo continental euro-brasileiro e os haplótipos associados a estas mutações, indicam a presença de um componente Mediterrâneo na formação da população brasileira de origem européia;
- 9- Em relação ao grupo continental afro-brasileiro observou-se, pela grande porcentagem de mutações novas, que há muita informação ainda desconhecida sobre este grupo populacional. Devido a isto, maiores pesquisas são necessárias para que se conheça o real perfil deste conjunto na população brasileira;
- 10- Foram identificadas duas novas mutações (232 del 18 e W1282G) e um novo polimorfismo (1716+85C/T) no grupo continental euro-brasileiro. No grupo continental afro-brasileiro foram identificadas cinco novas mutações (565 del C, I148N, E504X, Q552K, e G1247R);
- 11- A análise de associação entre os alelos dos marcadores intra-gênicos IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA (e haplótipos formados por estes) mostrou-se importante facilitador na identificação de mutações;
- 12- A caracterização das freqüências alélicas e haplotípicas dos marcadores IVS8CA, IVS17bTA, e IVS17bCA permitem que o Aconselhamento Genético para famílias brasileiras com um afetado ou com história familiar de FC seja realizado de maneira bem mais precisa;
- 13- Foi identificada uma mutação no microssatélite IVS17bTA, dando nova informação para inferências sobre idade de surgimento de mutações no gene CFTR.

REFERÊNCIAS

ABELIOVICH, D.; PASHUT-LAVON, I.; LERER, I.; COHEN, T.; SPRINGER, C.; AVITAL, A.; CUTTING, G.R. Screening for 5 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*, v. 51, p. 951-956, 1992.

ACTON, J.D.; WILMOTT, R.W. Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Paediatr Respir Rev*, v. 2, n. 4, p. 332-339, 2001.

ALTON, E.; MIDDLETON, P.; CAPLEN, N.; SMITH, S.; STEEL, D.; MUNKONGE, F.; JEFFERY, P.; GEDDES, D.; HART, S.; WILLIAMSON, R.; FASOLD, K.; MILLER, A.; DICKINSON, P.; STEVENSON, B.; McLACHLAND, G.; DORIN, J.; PORTEUS, D. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nature Genetics*. v.5, p.135-142, 1993.

AMÉRICA LATINA. **Registro de dados de pacientes**, 1996.

ANDERSON, D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am. J. Dis. Child*. v.56, p.344-399, 1938.

ANDERSON, M.P.; BERGER, H.A.; RICH, D.P.; GREGORY, R.J.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*. v.67, p.775-784, 1991a.

ANDERSON, M.P.; GREGORY, R.J.; THOMPSON, S.; SOUZA, D.W.; SUCHARITA, P.; MULLIGAN, R.C.; SMITH, A.; WELSH, M.J. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*. v.253, p.202-205, 1991b.

ANDERSON, M.P.; RICH, D.P.; GREGORY, R.J.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science*, v. 251, p. 679-682, 1991c.

ANDERSON, M.P.; SHEPPARD, D.N.; BERGER, H.A.; WELSH, M.J. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am J Physiol*, v. 263, p. L1-14, 1992.

ANDERSON, M.P.; WELSH, M.J. Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science*, v. 254, n. 5077, p. 1701-1704, 1992.

ANGUIANO, A.; OATES, R.D.; AMOS, J.A.; DEAN, M.; GERRARD, B.; STEWART, C.; MAHER, T.A.; WHITE, M.B.; MILUNSKY, A. Congenital

bilateral absence of the vas deferents: a primarily genital form of cystic fibrosis. **JAMA**, v. 267, p. 1794-1797, 1992.

ARON, Y.; POLLA, B.S.; BIENVENU, T.; DALL'AVA, J.; DUSSER, D.; HUBERT, D. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 159, p. 1464-1468, 1999.

AZEVÊDO, E.E. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. **Ann Hum Genet**, v. 44, p. 55-60, 1980.

AZEVÊDO, E.S.; FORTUNA, C.M.M.; SILVA, K.M.C.; SOUSA, M.G.F.; MACHADO, M.A.; LIMA, A.M.V.M.D.; AGUIAR, M.E.; ABÉ, K.; EULÁLIO, M.C.M.N.; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.B.O.; SANTOS, M.G. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Hum Biol**, v. 54, n. 2, p. 329-341, 1982.

BARGON, J.; TRAPNELL, B.; CHU, C.; ROSENTHAL, C.; YOSHIMURA, K.; GUGGINO, W.; DALEMANS, W.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, P.; CRYSTAL, R. Down regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene, expression by agents that modulate intracellular divalent cations. **Mol. Cell. Biol.** v.12, p.1872-1878, 1992a.

BARGON, J.; TRAPNELL, B.C.; YOSHIMURA, K.; DALEMANS, W.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; CRYSTAL, R.G. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene can be regulated by protein kinase C. **J Biol Chem**, v. 267, n. 23, p. 16056-16060, 1992b.

BEAR, C.; DUGUAY, F.; NAISMITH, A.; KARTNER, N.; HANRAHAN, J.; RIORDAN, J. Cl-channel activity in *Xenopus oocytes* expressing the cystic fibrosis gene. **J. Biol. Chem.** v.266, p.19142-19145, 1991.

BEAUDET, A.; BOWCOCK, A.; BUCHWALD, M.; CAVALLI-SFORZA, L.; FARRAL, M.; KING, M.C.; KLINGER, K.; LALOUEL, J.M.; LATHROP, G.; NAYLOR, S.; OTT, J.; TSUI, L.C.; WAINWRIGHT, B.; WATKINS, P.; WHITE, R.; WILLIAMSON, R. Linkage of cystic fibrosis to two tightly linked DNA markers: joint report from a collaborative study. **Am J Hum Genet**, v. 39, p. 681-693, 1986.

BEAUDET, A.L.; FELDMAN, G.L.; FERNBACH, S.D.; BUFFONE, G.J.; O'BRIEN, W.E. Linkage disequilibrium, cystic fibrosis, and genetic counseling. **Am J Hum Genet**, v. 44, p. 319-326, 1989.

BERNARDINO, A.L.; FERRI, A.; PASSOS-BUENO, M.R.; KIM, C.E.; NAKAIE, C.M.; GOMES, C.E.; DAMACENO, N.; ZATZ, M. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. **Genet Test**, v. 4, n. 1, p. 69-74, 2000.

BERTRANPETIT, J.; CALAFELL, F. Genetic and geographical variability in cystic fibrosis: evolutionary considerations. **Ciba Found Symp**, v.197, p. 97-114, 1996.

BIRD, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. **Nature**. v. 321, p. 209-213, 1986.

BOAT, T.F.; WELSH, M.J.; BAUDET, A.L. Cystic Fibrosis. In SCRIVER, C.R. e cols. (eds): **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. 6th ed. McGraw-Hill: New York, 1989. p. 2649-2680.

BOBADILLA, J.L.; MACEK Jr.M.; FINE, J.P.; FARELL, P.M. Cystic fibrosis: A worldwide análisis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. **Hum Mutat**, v. 19, p. 575-606, 2002.

BOIS, E.; FEINGOLD, J.; DEMENAIS, F.; RUNAVOT, Y.; JEHANNE, M.; TOUDIC, L. Cluster of cystic fibrosis cases in a limited area of Brittany (France). **Clin Genet**, v. 14, n. 2, p. 73-76, 1978.

BRADBURY, N.; JILLING, T.; BERTA, G.; KIRK, K. Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. **Science**. v.256, p.530-532, 1992.

BRAEKELEER, M.; DAIGNEAULT, J. Spatial distribution of the ΔF -508 mutation in cystic fibrosis: a review. **Hum Biol**, v. 64, n. 2, p. 167-174, 1992.

BRAEKELEER, M.; CHAVENTRE, A.; BERTORELLE, G.; VERLINGUE, C.; RAGUENES, O.; MERCIER, B.; FEREC, C. Linkage disequilibrium between the four most common cystic fibrosis mutations and microsatellite haplotypes in the Celtic population of Brittany. **Hum Genet**, v. 98, n. 2, p. 223-227, 1996.

BREMER, S.; HOOF, T.; WILKE, M.; BUSCHE, R.; SCHOLTE, B.; RIORDAN, J.; MAASS, G.; TÜMMLER, B. Quantitative expression patterns of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced cystic fibrosis transmembrane regulator mRNA transcripts in human epithelia. **Eur. J. Biochem.** v. 206, p.137-149, 1992.

BREUER, W.; KARTENER, N.; RIORDAN, J.; CABANTCHICK, Z. Induction of expression of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. **J. Biol. Chem.** v.267, p.10465-10469, 1992.

BRUNECKY, Z. The incidence and genetics of cystic fibrosis. **J Med Genet**, v. 9, n. 1, p. 33-37, 1972.

CABELLO, G.M.; MOREIRA, A.F.; HOROVITZ, D.; CORREIA, P.; SANTA ROSA, A.; LLERENA, J. JR.; GREG, J.; GRODY, W.W.; DEGRAVE, W.M.; FERNANDES, O.; CABELLO, P.H.. Cystic fibrosis: low frequency of DF508

mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. **Hum Biol**, v. 71, n. 2, p 189-196, 1999.

CABELLO, G.M.; CABELLO, E.H. JR.; FERNANDE, O.; HARRIS, A. The 3120 +1G-->A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian cystic fibrosis patients. **Hum Biol**, v.73, n. 3, p. 403-409, 2001.

CAMARGO NETO, E.; SILVA, J.A; FERRARI, S.R.; COSTA, C.C. Importância da análise molecular da mutação $\Delta F508$ no diagnóstico neonatal da fibrose cística. **Laes & Haes**, v.36, p. 100-104, 1998.

CAMARGOS, P.A.; GUIMARÃES, M.D.; REIS, F.J. Prognostic aspects of cystic fibrosis in Brazil. **Ann Trop Paediatr**, v. 20, n. 4, p. 287-291, 2000.

CARLES, S.; DESGEORGES, M.; GOLDMAN, A.; THIART, R.; GUITTARD, C.; KITAZOS, C.A.; de RAVEL, T.J.L.; WESTWOOD, A.T.R.; CLAUSTRES, M.; RAMSAY, M. First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of southern African origin. **J Med Genet**, v. 33, n. 9, p. 802-804, 1996.

CARTER, C.O. Genetic aspects of cystic fibrosis of the pancreas. **Bibl Paediatr**, v. 86, p. 372-380, 1967.

CASALS, T.; NUNES, V.; LAZARO, C.; GIMENEZ, F.J.; GIRBAU, E.; VOLPINI, V.; ESTIVILL, X. Mutation and linkage disequilibrium analysis in genetic counseling of Spanish cystic fibrosis families. **J Med Genet**, v. 28, n. 11, p. 771-776, 1991.

CASALS, T.; PACHECO, P.; BARRETO, C.; GIMENEZ, J.; RAMOS, M.D.; PEREIRA, S.; PINHEIRO, J.A.; COBOS, N.; CURVELO, A.; VAZQUEZ, C.; ROCHA, H.; SECULI, J.L.; PEREZ, E.; DAPENA, J.; CARRILHO, E.; DUARTE, A.; PALACIO, A.M.; NUNES, V.; LAVINHA, J.; ESTIVILL, X. Missense mutation R1066C in the second transmembrane domain of CFTR causes a severe cystic fibrosis phenotype: study of 19 heterozygous and 2 homozygous patients. **Hum Mutat**, v. 10, n. 5, p. 387-392, 1997.

CASALS, T.; RAMOS, M.D.; GIMENEZ, J.; NADAL, M.; NUNES, V.; ESTIVILL, X. Paternal origin of a de novo novel CFTR mutation (L1065R) causing cystic fibrosis. **Hum Mutat**, Suppl 1, p. S99-102, 1998.

CASHMAN, S.M.; PATINO, A.; MARTINEZ, A.; GARCIA-DELGADO, M.; MIEDZYBRODZKA, Z.; SCHWARZ, M.; SHRIMPTON, A.; FEREC, C.; RAGUENES, O.; MACEK, M. JR. Identical intragenic microsatellite haplotype found in cystic fibrosis chromosomes bearing mutation G551D in Irish, English, Scottish, Breton and Czech patients. **Hum Hered**, v. 45, n. 1, p. 6-12, 1995.

CASTALDO, G.; FUCCIO, A.; CAZENEUVE, C.; PICCI, L.; SALVATORE, D.; RAI, V.; SCARPA, M.; GOOSSENS, M.; SALVATORE, F. Detection of five

rare cystic fibrosis mutations peculiar to Southern Italy: implications in screening for the disease and phenotype characterization for patients with homozygote mutations. **Clin Chem**, v. 45, n. 7, p.957-962, 1999.

CASTALDO, G.; FUCCIO, A.; SALVATORE, D.; RAIÀ, V.; SANTOSTASI, T.; LEONARDI, S.; LIZZI, N.; LA ROSA, M.; RIGILLO, N.; SALVATORE, F. Liver expression in cystic fibrosis could be modulated by genetic factors different from the cystic fibrosis transmembrane regulator genotype. **Am J Med Genet**, v. 98, n. 4, p. 294-297, 2001.

CFGAC (The Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium). Population variation of common cystic fibrosis mutation. **Hum Mut**, v. 4, n. 3, p. 167-177, 1994.

CFGAC (The Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>, 1996.

CFGAC (The Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>, 1999.

CFGAC (The Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>, 2003.

CFGPC (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium). Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. **N Eng J Med**, v. 329, n. 18, p. 1308-1313, 1993.

CHADLE, J.; GOODCHILD, M.; MEREDITH, A. Direct sequencing of the complete CFTR gene: the molecular characterization of 99.5% of CF chromosomes in Wales. **Hum.Molec.Genet.** v.2, p.1551-1556, 1993

CHEHAB, F.F.; JOHNSON, J.; LOUIE, E.; GOOSSENS, M.; KAWASAKI, E.; ERLICH, H. A dimorphic 4-bp repeat in the cystic fibrosis gene is in absolute linkage disequilibrium with the delta F508 mutation: implications for prenatal diagnosis and mutation origin. **Am J Hum Genet**, v. 48, n. 2, p. 223-226, 1991.

CHELLY, J.; GILGENKRANTZ, H.; LAMBERT, M.; HAMARD, G.; CHAFEY, P.; RECAN, D.; KATZ, P.; CHAPELLE, A.; KOENIG, M.; GINJAAR, I.; FARDEAU, M.; TOME, F.; KAHN, A.; KAPLAN, J. Effects of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. **Cell**. v.63, p.1239-1248, 1990.

CHENG, S.; RICH, D.; MARSHALL, J.; GREGORY, R.; WELSH, M.; SMITH, A. Phosphorilation of the R-Domain by c-AMP-dependent protein Kinase regulates the CFTR chloride channel. **Cell**. v.66, p.1027-1036, 1991.

CHERTKOFF, L.; VISICH, A.; BIENVENU, T.; GRENOVILLE, M.; SEGAL, E.; CARNIGLIA, L.; KAPLAN, J.C.; BARREIRO, C. Spectrum of CFTR mutations in Argentine cystic fibrosis patients. **Clin Genet**, v. 51, p. 43-47, 1997.

CHEVALIER-PORST, F.; BONARDOT, A.M.; CHAZALETTE, J.P.; MATHIEU, M.; BOZON, D. 40 kilobase deletion (CF 40 kb del 4-10) removes exons 4 to 10 of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene. **Hum Mutat**, Suppl 1 p. S291-294, 1998.

CHILLÓN, M. **Análisis genético y molecular del gen de la fibrosis quística (CFTR): identificación y caracterización de mutaciones.** Barcelona – España, 1994. Tese (Doutorado em Biología) - Departamento de Genética, Universitat de Barcelona.

CHILLÓN, M.; CASALS, T.; GIMÉNEZ, J.; NUNES, V.; ESTIVILL, X. Analysis of the CFTR gene in the Spanish population: SSCP-screening for 60 known mutations and identification of four new mutation. **Hum. Mut.** v.3, p.223-230, 1994a.

CHILLÓN, M.; CASALS, T.; GIMÉNEZ, J.; RAMOS, D.; PALACIO, A.; MORRAL, N.; ESTIVILL, X.; NUNES, V. Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. **Hum. Genet.** v.93, p.447-451, 1994b.

CHILLÓN, M.; DORK, T.; CASALS, T.; GIMENEZ, J.; FONKNECHTEN, N.; WILL, K.; RAMOS, D.; NUNES, V.; ESTIVILL, X. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene, created by mutation 1811+1.6kbA-->G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. **Am J Hum Genet**, v. 56, n. 3, p. 623-629, 1995.

CHU, C.S.; TRAPNELL, B.C.; MURTAGH, J.J.Jr.; MOSS, J.; DALEMANS, W.; JALLAT, S.; MERCENIER, A.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; CUTTING, G.R.; GUGGINO, W.B.; CRYSTAL, R.G. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. **EMBO J**, v. 10, p. 1355-1363, 1991.

CHU, C.S.; TRAPNELL, B.C.; CURRISTIN, S.; CUTTING, G.R.; CRYSTAL, R.G. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. **Nat Genet**, v. 3, p. 151-156, 1993.

CLAUSTRES, M.; LAUSSEL, M.; DESGEORGES, M.; GIANSILY, M.; CULARD, J.F.; RAZAKATSARA, G.; DEMAILLE, J. Analysis of the 27 exons and flanking regions of the cystic fibrosis gene: 40 different mutations account for 91.2% of the mutant alleles in southern France. **Hum Mol Genet**, v. 2, p. 1209-1213, 1993.

CLAUSTRES, M.; DESGEORGES, M.; MOINE, P.; MORRAL, N.; ESTIVILL, X. CFTR haplotypic variability for normal and mutant genes in cystic fibrosis families from southern France. *Hum Genet*, v. 98, n. 3, p. 336-344, 1996.

COLLINS, F. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. v.256, p.774-779, 1992.

COHN, J.A.; NAIRN, A.C.; MARINO, C.R.; MELHUS, O.; KOLE, J. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a colonocyte cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89. n. 6, p. 2340-2344, 1992.

COOPER, D.N.; KRAWCZAK, M. Mutation rates in humans. In: BIOS Scientific Publishers Limited. **Human gene mutation**. Oxford: St. Thomas House, p. 321-329, 1993.

COUELLE, C.; DOUAR, A.M.; COLLEDGE, W.H.; FROSTER, U. The challenge of fetal gene therapy. *Nat Med*, v. 1, n. 9, p. 864-866, 1995.

CRAWFORD, I.; MALONEY, P.; ZEITLIN, P.; GUGGINO, W.; HYDE, S.; TURLEY, H.; GATTER, K.; HARRIS, A. Immuno-cytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.88, p.9262-9266, 1991.

CREMONESI, L.; CAINARCA, S.; ROSSI, A.; PADOAN, R.; FERRARI, M. Detection of a de novo R1066H mutation in an Italian patient affected by cystic fibrosis. *Hum Genet*, v. 98, n. 1, p. 119-121, 1996.

CUPPENS, H.; MARYNEN, P.; DE BOECK, C.; DE BAETS, F.; EGGERMONT, E.; BERGUE, H.; CASSIMAN, J.J. A child, homozygous for a stop codon in exon 11, shows milder cystic fibrosis symptoms than her heterozygous nephew. *J Med Genet*, v. 27, p. 717-719, 1990.

CUPPENS, H.; MARYNEN, P.; DE BOECK, C.; CASSIMAN, J.J. Detection of 98,5% of the mutations in 200 Belgian cystic fibrosis alleles by reverse dot-blot and sequencing of the complete coding region and exon/intron junctions of the CFTR gene. *Genomics*, v. 18, p. 693-697, 1993.

CUTTING, G.R.; KARSH, L.M.; ROSENSTEIN, B.J.; ZIELENSKI, B.J.; TSUI, S.C.; ANTONARAKIS, S.E.; KAZAZIAN, H.H.Jr. A cluster of cystic fibrosis mutation in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature*, v. 346, p. 366-369, 1990.

CUTTING, G.R. Genetic epidemiology and genotype/phenotype correlations. In: **National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Genetic Testing for Cystic Fibrosis**. Bethesda, MD: NIH Consensus Development Conference on Genetic testing for Cystic Fibrosis, 1997. p. 1-25.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Cystic Fibrosis Foundation, **Patient Registry 1996 Annual Data Report**. Bethesda, Mariland, 1997.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Cystic Fibrosis Foundation, **Patient Registry 1999 Annual Data Report**. Bethesda, Mariland, 2000.

DALEMANS, W.; BARBRY, P.; CHAMPIGNY, G.; JALLAT, S.; DOTT, K.; DREYER, D.; CRYSTAL, R.G.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; LAZDUNSKI, M. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*, v. 354, n. 6354, p. 526-528, 1991.

DAMACENO, N. **Correlação do genótipo Δ F508 e fenótipo pulmonar em 40 afetados com fibrose cística**. São Paulo, 1996. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo.

DANKS, D.M.; ALLAN, J.; ANDERSON, C.M. A genetic study of fibrocystic disease of the pancreas. *Ann Hum Genet*, v. 28, p. 323-356, 1965.

DANKS, D.M.; ALLAN, J.; PHELAN, P.D.; CHAPMAN, C. Mutations at more than one locus may be involved in cystic fibrosis - Evidence based on first-cousin data and direct counting of cases. *Am J Hum Genet*, v. 35, n. 5, p. 838-844, 1983.

DELANEY, S.; RICH, D.; THOMSON, S.; HARGRAVE, M.; LOVELOCK, P.; WELSH, M.; WAINWRIGHT, B. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nature Genetics*. v.4, p.426-431, 1996

DENNING, G.M.; ANDERSON, M.P.; AMARA, J.F.; MARSHALL, J.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, v. 358, n. 6389, p. 761-764, 1992a.

DENNING, G.M.; OSTEDGAARD, L.S.; CHENG, S.H.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest*, v. 89, p. 339-349, 1992b.

Di SANT'AGNESE, P.; DARLING, R.; PERERA, G.; SHEA, E. Abnormal electrolytic composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. Clinical significance and relationship of the disease. *Pediatrics*. v.12, p.549-563, 1953.

DONNISON, A.B.; SHWACHMAN, H.; GROSS, R.E. A review of 164 children with meconium ileus seen at the Children's Hospital Medical Center, Boston. *Pediatrics*, v. 37, n. 5, p. 833-850, 1966.

DÖRK, T.; WULBRAND, U.; RICHTER, T.; NEUMANN, T.; WOLFES, H.; WULF, B.; MAAB, G.; TÜMMLER, B. Cystic fibrosis with three mutations in the

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Hum Genet**, v. 87, p. 441-446, 1991.

DÖRK, T.; NEUMANN, T.; WULBRAND, U.; WULF, B.; KALIN, N.; MAAB, G.; KRAWCZAK, M.; GUILLERMIT, H.; FÉREC, C.; HORN, G.; KLINGER, K.; KEREM, B.S.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.C.; TÜMMLER, B. Intra and extragenic marker haplotypes of CFTR mutations in cystic fibrosis families. **Hum Genet**, v. 88, p. 417-425, 1992.

DÖRK, T.; MACEK, M. JR.; MEKUS, F.; TUMMLER, B.; TZOUNTZOURIS, J.; CASALS, T.; KREBSOVA, A.; KOUDOVA, M.; SAKMARYOVA, I.; MACEK, M. SR.; VAVROVA, V.; ZEMKOVA, D.; GINTER, E.; PETROVA, N.V.; IVASCHENKO, T.; BARANOV, V.; WITT, M.; POGORZELSKI, A.; BAL, J.; ZEKANOWSKY, C.; WAGNER, K.; STUHRMANN, M.; BAUER, I.; SEYDEWITZ, H.H.; NEUMANN, T.; JAKUBICZKA, S. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. **Hum Genet**, v. 106, n. 3, p. 259-268, 2000.

DRUMM, M.; POPE, H.; CLIFF, W.; ROMMENS, J.; MARVIN, S.; TSUI, L.C.; COLLINS, F.; FRIZALL, R.; WILSON, J. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. **Cell**, v.62, p.1227-1233, 1990.

DRUMM, M.; WILKINSON, D.; SMIT, L.; WORREL, R.; STRONG, T.; FRIZELL, R.; DAWSON, R.; COLLINS, F. Chloride conductance expressed by $\Delta F508$ and other mutant CFTRs in *Xenopus oocytes*. **Science**, v.254, p.1797-1799, 1991.

DURNO, C.; COREY, M.; ZIELENSKI, J.; TULLIS, E.; TSUI, L.C.; DURIE, P. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1857-1864, 2002.

EGAN, M.; FLOTTE, T.; AFIONE, S.; SOLOW, R.; ZEITLIN, P.L.; CARTER, B.J.; GUGGINO, W.B. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 581-584, 1992.

EIBERG, H.; MOHR, J.; SCHMIEGELOW, K.; NIELSEN, L.S.; WILLIAMSON, R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteny. **Clin Genet**, v. 28, p. 265-271, 1985.

ENGELHARDT, J.F.; YANG, Y.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.D.; ALLEN, E.D.; KOZARSKY, K.; PERRICAUDET, M.; YANKASKAS, J.R.; WILSON, J.M. Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. **Nat Genet**, v. 4, n. 1, p. 24-37, 1993.

ERCF, **Annual report**, v. 23, 1998.

ESTIVILL, X.; FARRAL, M.; SCAMBLER, P.J.; BELL, G.; HAWLEY, K.M.F.; LENCH, N.J.; BATES, G.P.; KRUYER, H.C.; FREDERICK, P.A.; STANIER, P.; WATSON, E.K.; WILLIAMSON, R.; WAINWRIGHT, B.J. A candidate for the cystic fibrosis gene isolated by selection for methylation-free islands. **Nature**, v. 326, p. 840-845, 1987a.

ESTIVILL, X.; SCAMBLER, P.J.; WAINWRIGHT, B.J.; HAWLEY, K.; FREDERICK, P.; BAIGET, M.; KERE, J.; WILLIAMSON, R.; FARRAL, M. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. **Genomics**, v. 1, p. 257-263, 1987b.

ESTIVILL, X.; McLEAN, C.; NUNES, V.; CASALS, T.; GALLANO, P.; SCAMBLER, P.; WILLIAMSON, R. Isolation of a new DNA marker in linkage disequilibrium with cystic fibrosis situated between J3.11 (D7S8) and IRP. **Am J Hum Genet**, v. 44, p. 704-710, 1989a.

ESTIVILL, X.; GASPARINI, P.; NOVELLI, G.; CASALS, T.; NUNES, V.; GALLANO, P.; SAVOIA, A.; RUZZO, A.; DALLAPICCOLA, B.; PIGNATTI, P.F. Linkage disequilibrium for DNA haplotypes near the cystic fibrosis locus in two south European populations. **Hum Genet**, v. 83, p. 175-178, 1989b.

ESTIVILL, X.; BANCELLS, C.; RAMOS, C.; BIOMED CF MUTATION ANALYSIS CONSORTIUM. Geographic distribution and regional origin of 264 cystic fibrosis mutations in European population. **Hum Mutat**, v. 10, n. 2, p. 135-154, 1997.

EWGCFG (EUROPEAN WORKING GROUP ON CYSTIC FIBROSIS GENETICS). Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. **Hum Genet**, v. 85, p. 391-445, 1990.

EWGCFG (EUROPEAN WORKING GROUP ON CYSTIC FIBROSIS GENETICS). No evidence for segregation distortion of cystic fibrosis alleles among sibs of cystic fibrosis patients. **Eur J Hum Genet**, v. 3, p. 324-325, 1995.

FANCONI, G.; UEHLINGER, E.; KNAUER, C. Angeborener zystischer pankreas fibromatose und bronkiektasien. **Wien Med. Wochenschr.** v.86, p.753-756, 1936.

FARBER, S. Some organic digestive disturbances in early life. **J. Michigan Med. Soc.** v.44, p.587, 1945.

FÉREC, C.; AUDRÉZET, M.P.; MERCIER, B.; GUILLERMIT, H.; MOULLIER, P.; QUERE, I.; VERLINGUE, C. Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. **Nat Genetics**, v. 1, p. 188-191, 1992.

FERNANDES, O.; GUTIERREZ, B.; DEGRAVE, W.; HYGA, L.; MORAES, L.; HOROVITZ, D.; ALMEIDA, J.C.C.; LLERENA Jr., J. Determinação do genótipo de fibrocísticos numa amostra hospitalar do Rio de Janeiro. **Rev Bras Pat Clin**, v. 30, n. 4, p. 159-163, 1994.

FERRI, A. **Estudo de mutações do gene da fibrose cística em indivíduos normais e afetados da população Brasileira**. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado em Genética) - Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

FITZSIMMONS, S.C. Cystic fibrosis foundation patient registry. **Annual Data Report**, Bethesda, MD, 1992.

FITZSIMMONS, S.C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **J Pediatr**, v. 122, p. 1-9, 1993.

GAIDZINSKI, D. **Fibrose cística: estudo sobre o impacto de uma doença genética crônica no núcleo familiar**. Porto Alegre, 1992. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GASPARINI, P.; DOGNINI, M.; BONIZZATO, A.; PIGNATTI, P.F.; MORRAL, N.; ESTIVILL, X. A tetranucleotide repeat polymorphism in the cystic fibrosis gene. **Hum Genet**, v. 86, n. 6, p. 625, 1991.

GIBSON, L.E.; COOK, R.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of Pancreas utilizing Pilocarpine by iontoforesis. **Pediatrics**, v. 23, p. 545-549, 1959.

GOODCHILD, M.C.; INSLEY, J.; RUSHTON, D.I.; GAZE, H. Cystic fibrosis in 3 Pakistani children. **Arch Dis Child**, v. 49, n. 9, p. 739-741, 1974.

GREBE, T.A.; SELTZER, W.K.; DeMARCHI, J.; SILVA, D.K.; DOANE, W.W.; GOZAL, D.; RICHTER, S.F.; BOWMAN, C.M.; NORMAN, R. A.; RHODES, S.N.; HERNRIED, L.S.; MURPHY, S.; HARWOOD, I.R.; ACCURSO, F.J.; JAIN, K.D. Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. **Am J Hum Genet**, v. 54, p. 443, 1994.

GRIESENBACH, U.; ALTON, E.W. Recent progress in gene therapy for cystic fibrosis. **Curr Opin Mol Ther**, v. 3, n. 4, p. 385-389, 2001.

GRIESENBACH, U.; FERRARI, S.; GEDDES, D.M.; ALTON, E.W. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. **Gene Ther**, v. 9, n. 20, p. 1344-1350, 2002.

GROVÉ, M.N. Cystic fibrosis in Angola: first resport in african population. **Curr Antropol**, v. 1, p. 345-348, 1959.

HALIASSOS, A.; CHOMEL, J.C.; GRANDJOUAN, S.; KRUIH, J.; KAPLAN, J.C.; KITZIS, A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. **Nucleic Acids Res**, v. 17, n. 20, p. 8093-8099, 1989.

HALL, B.D.; SIMPKISS, M.J. Incidence of fibrocystic disease in Wessex. **J Med Genet**, v. 5, n. 4, p. 262-265, 1968.

HAMOSH, A.; FITZ-SIMMONS, S.C.; MACEK, M. JR.; KNOWLES, M.R.; ROSENSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. **J Pediatr**, v. 132, n. 2, p. 255-259, 1998.

HENRY, M.T.; CAVE, S.; RENDALL, J.; O'CONNOR, C.M.; MORGAN, K.; FITZGERALD, M.X.; KALSHEKER, N. An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. **Eur J Hum Genet**, v. 9, n. 4, p. 273-278, 2001.

HILL, I.D.; MACDONALD, W.B.; BOWIE, M.D.; IRELAND, J.D. Cystic fibrosis in Cape Town. **S Afr Med J**, v. 73, n. 3, p. 147-149, 1988.

HOUSTEK, J.; VÁVROVÁ, V. Notre expérience à propos de la mucoviscidose. **Rev Med Liegè**, v. 22, n. 15, p. 421-426, 1967.

HUGHES, D.; HILL, A.; REDMOND, A.; NEVIN, N.; GRAHAM, C. Fluorescent multiplex microsatellites used to identify haplotype associations with 15 CFTR mutations in 124 Northern Irish CF families. **Hum Genet**, v. 95, n. 4, p. 462-464, 1995.

HUGHES, D.; WALLACE, A.; TAYLOR, J.; TASSABEHJI, M.; MCMAHON, R.; HILL, A.; NEVIN, N.; GRAHAM, C. Fluorescent multiplex microsatellites used to define haplotypes associated with 75 CFTR mutations from the UK on 437 CF chromosomes. **Hum Mutat.**, v. 8, n. 3, p. 229-235, 1996.

HUXLEY, C. Mammalian artificial chromosomes: a new tool for gene therapy. **Gene Ther.**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 1994.

IMANISHI, T.; AZAKA, T.; KIMURA, A.; TOKUNAGA, K.; GOJOBORI, T.; Estimation of allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci. In: TSUJI, K.; AIZAWA, M.; SASAZUKI, T. **HLA 1991**, v. 1, Oxford University Press:Oxford, 1992. p. 157-162.

JARVI, K.; ZIELENSKI, J.; WILSCHANSKI, M.; DURIE, P.; BUCKSPAN, M.; TULLIS, E.; MARKIEWICZ, D.; TSUI, L.C. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. **Lancet**, v. 345, n. 8964, p. 1578, 1995.

JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 2, p. 408, 1990.

JOHNSON, L.G.; OLSEN, J.C.; SARKADI, B.; MOORE, K.L.; SWANSTROM, R.; BOUCHER, R.C. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. **Nat Genet**, v. 2, n. 1, p. 21-25, 1992.

JOHNSON, L.G. Retroviral approaches to gene therapy of cystic fibrosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 953, p. 43-52, 2001.

JONES, M.B. Years of life lost due to cystic fibrosis. **J Chronic Dis**, v. 33, n. 11-12, p. 697-701, 1980.

KARTNER, N.; HANRAHAN, J.W.; JENSEN, T.J.; NAISMITH, A.L.; SUN, S.Z.; ACKERLEY, C.A.; REYES, E.F.; TSUI, L.C.; ROMMENS, J.M.; BEAR, C.E. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. **Cell**, v. 64, n. 4, p. 681-691, 1991.

KASHII, S.; ITO, K.; MONDEN, S.; SASAI, Y.; TSCHIDE, K.; FUJITA, M.; KAWAMOTO, H.; NARIOKA, M.; OKUMA, M. Adenosine deaminase deficiency due to heterozygous abnormality consisting of a deletion of exon 7 and the absence of enzyme mRNA. **J. Biol. Biochem.** v.47, p.49-53, 1991.

KERE, J.; ESTIVILL, X.; CHILLON, M.; MORRAL, N.; NUNES, V.; NORIO, R.; SAVILAHTI, E.; DELACHAPELE, E. Cystic fibrosis in a low-incidence population - two major mutations in Finland. **Hum Genet**, v.93, p. 162-166, 1994.

KEREM, B.S.; 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**, v. 245, p. 1073-1080, 1989.

KEREM, B.S.; COREY, M.; KEREM, B.S.; DURIE, P.; TSUI, L.C.; LEVISON, H. Clinical and genetic comparison of patients with cystic fibrosis with or without meconium ileus. **J Pediatr**, v. 114, p. 767-773, 1990

KIESEWETTER, S.; MACEK, M. JR.; DAVIS, C.; CURRISTIN, S.M.; CHU, C.S.; GRAHAM, C.; SHRIMPTON, A.E.; CASHMAN, S.M.; TSUI, L.C.; MICKLE, J. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. **Nat Genet**, v. 5, n. 3, p. 274-278, 1993.

KING, D.N.; HEELEY, A.F.; WALSH, M.P.; KUZEMKO, J.A. Sensitive trypsin assay for dried-blood specimens as a screening procedure for the early detection of cystic fibrosis. **Lancet**, v. ii, p. 1217-1219, 1979.

KITZIS, A.; CHOMEL, J.C.; HALIASSOS, A.; TESSON, L.; KAPLAN, J.C.; FEINGOLD, J.; GIRAUD, G.; LABLE, A.; DASTUGUE, B.; DUMUR, V.

Unusual segregation of cystic fibrosis alleles. *Nature*, v. 336, n. 6197, p. 316, 1988.

KNOWLES, M.R.; STUTTS, M.J.; SPOCK, A.; FISHER, N.; GATZY, J.T.; BOUCHER, R.C. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science*.v.221, p.1067-1070, 1983.

KNOWLTON, R.G.; COHEN-HAGUENAUER, O.; CONG, N.V.; FRÉZAL, J.; BROWN, V.A.; BARKER, D.; BRAMAN, J.C.; SCHUMM, J.W.; TSUI, L.C.; BUCHWALD, M.; DONIS-KELLER, H. A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature*, v. 318, p. 380-382, 1985.

KOCH, C.; CUPPENS, H.; RAINISIO, M.; MADESSANI, U.; HARMS, H.; HODSON, M.; MASTELLA, G.; NAVARRO, J.; STRANDVIK, B.; MCKENZIE, S. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2001.

KOH, J.; SFERRA, T.; COLLINS, F. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane regulator promoter region. *J. Biol. Chem.* v.268, p.15912-15921, 1993.

KRAMM, E.R.; CRANE, M.M.; SIRKIN, M.G.; BROWN, M.L. A cystic fibrosis pilot survey in three New England states. *Am J Public Health*, v. 52, p. 2041, 1962.

KRAWCZACK, M.; KONECKI, D.S.; SCHMIDTKE, J.; DÜCK, M.; ENGEL, W.; NÜTZENADEL, W.; TREFZ, F.K. Allelic association of the cystic fibrosis locus and two DNA markers, XV2C and KM19, in 55 German families. *Hum Genet*, v. 80, p. 78-80, 1988.

KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; MI, M.P.; AZEVÊDO, E.S.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in northeastern Brazil. *Ann Hum Genet*, v. 29, p. 113-125, 1965.

KULCZYCKI, L.L.; SCHAUF, V. Cystic fibrosis in blacks in Washington, DC: incidence and characteristics *Am J Dis Child*, v. 127, n. 1, p. 64-67, 1974.

KULCZYCKI, L.L.; KOSTUCH, M.; BELLANTI, J.A. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: Relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet*, v. 116, n. 3, p. 262-267, 2003.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER JR., J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LERER, I.; LAUFER-CAHANA, A.; RIVLIN, J.R.; AUGARTEN, A.; ABELIOVICH, D. A large deletion mutation in the CFTR gene (3120+1kdel8.6kb): a founder mutation in the Palestinian Arabs. *Mutation in brief* no. 231. Online. **Hum Mutat**, v. 13, n. 4, p. 337, 1999.

LEVESQUE, P.; HART, P.; HUME, J.; KENYON, J.; HOROWITZ, B. Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl-channels in heart. **Circulation Res.** v.71, p.1002-1007, 1992.

LEVIN, S. Fibrocystic disease of the pancreas. In: GOLDSCHMIDT, E. (ed): **Genetic of Migrant and Isolate Populations**. Baltimore: WILLIAMS & WILKINS, 1963. p. 294-299.

LEVIN, S.E.; BLUMBERG, H.; ZAMIT, R.; SCHMAMAN, A.; WAGSTAFF, L. Mucoviscidosis (cystic fibrosis of the pancreas) in Bantu twin neonates. **S Afr Med J**, v. 41, n. 19. p. 482-485, 1967.

LEVISON, H.; GODFREY, S. Pulmonary aspects of cystic fibrosis. In: MANGOS, J.A.; TALAMO, R.E. (eds): **Cystic fibrosis: Projections into the future**. New York: Stratten Intercontinental Medical Book, 1976.

LEWIS, E. **Cólera e fibrose cística – um novo exemplo de seleção natural de heterozigotos?** Porto Alegre, 1995. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LI, C.; RAMJEESINGH, M.; REYES, E.; JENSEN, T.; CHANG, X.; ROMMENS, J.; BEAR, C. The cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) does not influence the chloride channel activity of CFTR. **Nature Genetics**. v.3, p. 311-316, 1993.

LUCOTTE, G.; HAZOUT, S.; BRAEKELEER, M. Complete map of cystic fibrosis mutation $\Delta F508$ frequencies in western Europe and correlation between mutation frequencies and incidence of disease. **Hum Biol**, v. 67, n. 5, p. 797-803, 1995.

MacDOUGALL, L.G. Fibrocystic disease of the pancreas in African children. **Lancet**, v. 1, p. 409-410, 1962.

MACEK, M.J.; MACKOVA, A.; HAMOSH, A.; HILMAN, B.C.; SELDEN, R.F.; LUCOTTE, G.; FRIEDMAN, K.J.; KNOWLES, M.R.; ROSENSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. **Am J Hum Genet**, v. 60, p. 1122-1127, 1997.

MACRI, N.C.; GENTILE, S.A.; MANTEROLA, A.; TOMEZZOLI, S.; REIS, C.F.; GARCIA, L.I.; FERNADEZ, J.L.L. Epidemiology of cystic fibrosis in Latin America: Preliminary communication. **Ped Pulm**, v. 10, p. 249-253, 1991.

MAGNANI, C.; CREMONESI, L.; GIUNTA, A.; MAGNAGHI, P.; TARAMELLI, R.; FERRARI, M. Short direct repeats at the breakpoints of a novel large deletion in the CFTR gene suggest a likely slipped mispairing mechanism. **Hum Genet**, v. 98, n. 1, p. 102-108, 1996.

MARÓSTICA, P.J.C. **Avaliação pneumológica de pacientes portadores de fibrose cística: sua relação com grupos genéticos.** Porto Alegre, 1995. Dissertação (Doutorado em Pneumologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MARTINS, C.S.B.; RIBEIRO, F.; COSTA, F.F. Frequency of the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation in a population from São Paulo state, Brazil. **Brazilian J Med Biol Res**, v. 26, p. 1037-1040, 1993.

MATEU, E.; CALAFELL, F.; OSCAR, L.; BONNÉ-TAMIR, B.; KIDD, J.R.; PAKSTIS, A.; KIDD, K.K.; BERTRANPETIT, J. Worldwide genetic analysis of the CFTR region. **Am J Hum Genet**, v. 68, p. 103-117, 2001.

MATEU, E.; CALAFELL, F.; RAMOS, M.D.; CASALS, T.; BERTRANPETIT, J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? **Am J Hum Genet**, v. 70, n. 1, p. 257-264, 2002.

MATTIUZ, P.L.; IHDE, D.; PIAZZA, A.; CEPPELLINI, R.; BODMER, W.F. New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HL-A system. In TERASAKI, P.I. ed **Histocompatibilidade testing**, 1970.

McCOLLEY, S.A.; ROSENSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R.; SMITH, P.L. Differences in expression of cystic fibrosis in blacks and whites. **Am J Dis Child**, v. 145, n. 1, p. 94-97, 1991.

MERRITT, A.D.; HANNA, B.L.; TODD, C.W.; MYERS, T.L. Incidence and mode of inheritance of cystic fibrosis. **J Lab Clin Med**, v. 52, p. 2041, 1962.

MIRANDA, A.B.; LLERENA Jr., J.; DALLALANA, L.T.; MOURA-NETO, R.S.; SUFFYS, P.N.; DEGRAVE, W.M. Use of PCR for the frequency of the $\Delta F508$ mutation in Brazilian cystic fibrosis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 309-312, 1993.

MONNIER, N.; GOUT, J.P.; PIN, I.; GAUTHIER, G.; LUNARDI, J. A novel 3600+11.5 kb C>G homozygous splicing mutation in a black African, consanguineous CF family. **J Med Genet**, v. 38, n. 1, p. E4, 2001.

MONTROSE, C.; BLACKMON, D.; HAMOSH, A.; MONTROSE, M. Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene transcription and alternative RNA splicing in a model of developing intestinal epithelium. **J. Biol. Chem.** v.267, p.19299-19305, 1992.

MORRAL, N.; ESTIVILL, X. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1362-1364, 1992.

MORRAL, N.; NUNES, V.; CASALS, T.; ESTIVILL, X. CA/GT microsatellite alleles within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossing over. **Genomics**, v. 10, p. 692-698, 1991.

MORRAL, N.; NUNES, V.; CASALS, T.; CHILLÓN, M.; GIMÉNEZ, J.; BERTRANPETIT, J.; ESTIVILL, X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutations frameworks and evolutionary tracers. **Hum. Molec. Genetic.** v.2, p.1015-1022, 1993a.

MORRAL, N.; NUNES, V.; CASALS, T.; COBOS, N.; ASENSIO, O.; DAPENA, J.; ESTIVILL, X. Uniparental inheritance of microsatellite alleles of the cystic fibrosis gene (CFTR): identification of a 50 kilobase deletion. **Hum. Molec. Genetic.** v.2, n. 6, p.677-681, 1993b.

MORRAL, N.; LLEVADOT, R.; CASALS, T.; GASPARINI, P.; MACEK, M.; DÖRK, T.; ESTIVILL, X. Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X and 3849+10kbC→T provide evidence of mutation recurrence in the CFTR gene. **Am J Hum Genet**, v. 55, p. 890-898, 1994.

MORRAL, N.; DÖRK, T.; LLEVADOT, R.; DZIADEK, V.; MERCIER, B.; FÉREC, C.; COSTES, B.; GIRODON, E.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.C.; TUMMLER, B.; ESTIVILL, X. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. **Hum Genet**, v. 8, n. 2, p. 149-159, 1996.

MOULIN, D.S.; SMITH, A.N.; HARRIS, A. A CA repeat in the first intron of the CFTR gene. **Hum Hered**, v. 47, p. 295-297, 1997.

MOUNT, S. A catalogue of splice junctions sequences. **Nucleic Acid Res.** v.14, p.459-472, 1982.

NEVIN, G.B.; NEVIN, N.C.; REDMOND, A.D. Cystic fibrosis in Northern Ireland. **J Med Genet**, v. 16, n. 2, p. 122-124, 1979.

NUNES, V.; GASPARINI, P.; NOVELLI, G.; GAONA, A.; BONIZZATO, A.; SANGIUOLO, F.; BALASSOPOULOU, A.; GIMENEZ, F.J.; DOGNINI, M.; RAVNIK-GLAVAC, M. Analysis of 14 cystic fibrosis mutations in five south European populations. **Hum Genet**, v. 87, n. 6, p. 737-738, 1991.

OATES, R.D.; AMOS, J.A. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. **J Androl**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 1994.

OBER, C.; LESTER, L.A.; MOTT, C.; BILLSTRAND, C.; LEMKE, A.; VAN DER VEN, K.; MARCUS, S.; KRAUT, J.; LLOYD-STILL, J.; BOOTH, C. Ethnic heterogeneity and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) mutation frequencies in Chicago-area CF families. **Am J Hum Genet**, v. 51, n. 6, p. 1344-1348, 1992.

O'DEA, S.; HARRISON, D.J. CFTR gene transfer to lung epithelium--on the trail of a target cell. **Curr Gene Ther**, v. 2, n. 2, p. 173-181, 2002.

ONAY, T.; ZIELENSKI, J.; TOPALOGLU, O.; GOKGOZ, N.; KAYSERILI, H.; APAK, M.Y.; CAMCIOGLU, Y.; COKUGRAS, H.; AKCAKAYA, N.; TSUI, L.C.; KINDAR, B. Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Turkish cystic fibrosis patients. **Hum Biol**, v.73, n.2, p.191-203, 2001.

OROZCO, L.; VELAZQUEZ, R.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L.C.; CHAVEZ, H.; LEZANA, J.L.; SANDANA, Y.; HERNANDEZ, E.; CARNEVALE, A. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 416insGGGG and 297-1G:A). **Hum Genet**, v. 106, n. 3, p. 360-365, 2000.

PADOA, C.; GOLDMAN, A.; JENKINS, T.; RAMSAY, M. Cystic fibrosis carrier frequencies in populations of African origin. **J Med Genet**, v. 36, n. 1, p. 41-44, 1999.

PARIZOTTO, E.; BERTUZZO, C.S.; RIBEIRO, A.F. Molecular characterisation of cystic fibrosis patients in the state of São Paulo (Brazil). **J Hum Genet**, v. 34, n. 10, p. 877, 1997.

PATRIZIO, P.; ZIELENSKI, J. Congenital absence of the vas deferens: a mild form of cystic fibrosis. **Mol Med Today**, v. 2, n. 1, p. 24-31, 1996.

PAZ-Y-MINO, C.; PEREZ, J.C.; BURGOS, R.; DÁVALOS, M.V.; LEONE, P.E. The DeltaF508 mutation in Ecuador, South America. **Hum Mutat**, v. 14, n. 4, p. 348-350, 1999.

PEREIRA, L.; RASKIN, S.; FREUND, A.A.; RIBAS, P.D.; CASTRO, R.M.V.; PIGNATTI, P.F.; CULPI, L. Cystic fibrosis mutations Δ F508, R1162X and 2183AA:G in two southern states of Brazil. **Genet Mol Biol**, v. 22, n. 3, p. 291-294, 1998.

PHILLIPS, O.P.; BISHOP, C.; WOODS, D.; ELIAS, S. Cystic fibrosis mutations among African Americans in the southeastern United States. **J Natl Med Assoc**, v. 87, n. 6, p. 433-435, 1995.

PIGNATTI, P.F.; BOMBIERI, C.; BENETAZZO, M.; CASARTELLI, A.; TRABETTI, E.; GILE, L.S.; MARTINATI, L.C.; BONER, A.L.; LUISETTI, M.

CFTR gene variant IVS8-5T in disseminated bronchiectasis. **Am J Hum Genet**, v. 58, n. 4, p. 889-892, 1996.

PORTEUS, D.; DORIN, J. Gene therapy for cystic fibrosis-where and when?. **Hum. Molec. Genet.** v.2, p.211-212, 1993.

PROBST, C.M.; BOMPEIXE, E.P.; PEREIRA, N.F.; DALALIO, M.M.; VISENTAINER, J.E.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Hum Biol**, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

PUGH, R.J.; PICKUP, J.D. Cystic fibrosis in Leeds region: incidence and life expectancy. **Arch Dis Child**, v. 42, n. 225, p. 544-545, 1967.

QUINTON, P.M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. **Nature**, v. 301, p. 421-422, 1983.

RAMALHO, A.S.; BECK, S.; MEYER, M.; PENQUE, D.; CUTTING, G.R.; AMARAL, M.D. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 27, n. 5, p. 619-627, 2002.

RAMSAY, M.; WAINWRIGHT, B.J.; FARRAL, M.; ESTIVILL, X.; SUTHERLAND, H.; HO, M.F.; DAVIES, R.; HALFORD, S.; TATA, F.; WICKING, C.; LENCH, N.; BAUER, I.; FÉREC, C.; FARNDON, P.; KRUYER, H.; STANIER, P.; WILLIAMSON, R.; SCAMBLER, P.J. A new polymorphic locus, D7S411, isolated by cloning from preparative pulse-field gels is close to the mutation causing cystic fibrosis. **Genomics**, v. 6, p. 39-47, 1990.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; VNENCAK-JONES, C.; DAWSON, E.; KAPLAN, G.; McCLURE, M. Utility of internal markers to improve the accuracy of cystic fibrosis genotype analysis. **BioTechniques**, v. 13, n. 3, p. 372-374, 1992a.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; KAPLAN, G.; McCLURE, M.; VNENCAK-JONES, C. Cystic fibrosis genotyping by direct PCR analysis of Guthrie blood spots. **PCR Methods and Applications**, v. 2, p. 154-156, 1992b.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.S.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANI, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N.; PILOTTO, R.F. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am J Hum Genet**, v. 46, p. 665-669, 1993.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.S.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; DAWSON, E.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.;

MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANA, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N.; CULPI, L. Regional distribution of cystic fibrosis-linked DNA haplotypes in Brazil: multicenter study. **Hum Biol**, v. 69, n. 1, p. 75-88, 1997a.

RASKIN, S.; PHILLIPS III, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.S.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANA, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N. CULPI, L. Cystic fibrosis in the Brazilian population: $\Delta F508$ mutation and KM-19/XV-2C haplotype distribution. **Hum Biol**, v. 69, n. 4, p. 499-508, 1997b.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KAPLAN, G.; MCCLURE, M.; VNENCAK-JONES, C.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GIUGLIANI, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N.; PEREIRA, L.; FAUCZ, F.; GABARDO, J.; CULPI, L. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. **Hum Biol.**, v. 71, n. 1, p. 111-121, 1999.

RASKIN, S. **Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras**. Curitiba, 2001. Tese (Doutorado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná.

REBOUL, M.P.; BIETH, E.; FAYON, M.; BITEAU, N.; BARBIER, R.; DROMER, C.; DESGEORGES, M.; CLAUSTRES, M.; BREMONT, F.; LACOMBE, D.; IRON, A. Splice mutation 1811+1.6kbA>G causes severe cystic fibrosis with pancreatic insufficiency: report of 11 compound heterozygous and two homozygous patients. **J Med Genet**, v. 39, n. 11, p. 73, 2002.

REGLAFQ. Registro Latinoamericano de pacientes con fibrosis quística. **Registro de dados de pacientes**, 1992.

REGLAFQ. Registro Latinoamericano de pacientes con fibrosis quística. **Registro de dados de pacientes**, 1997.

REIS, F.J.; CAMARGOS, P.A.; ROCHA, S.D.E. Survival analysis for cystic fibrosis in Minas Gerais State, Brazil. **J Trop Pediatr**, v. 44, n. 6, p. 329-331, 1998.

RIBAS, P. D. **Estudos moleculares da fibrose cística: relação entre genótipo e origem étnica em uma amostra de pacientes do sul do Brasil**. Curitiba, 1996. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RICH, D.; ANDERSON, M.; GREGORY, R.; CHENG, S.; JEFFERSON, D.; WELSH, M. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Nature**. v.347, p.358-363, 1990.

RICH, D.; GREGORY, R.; ANDERSON, M.; MANAVALAN, P.; SMITH, A.; WELSH, M. Effects of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science*. v. 253, p.205-207, 1991.

RIORDAN, J.; ROMMENS, J.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, R.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAVSIC, N.; CHOU, J.; DRUMM, M.; IANNUZZI, M.; COLLINS, F.; TSUI, L.C. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. v.245, p.1066-1073, 1989.

RODMAN, H.M.; MATTHEWS, L.W. Hyperglycemia in cystic fibrosis: a review of the literature and our own patient experience. In WARWICK, W.J. (eds): **1000 years of cystic fibrosis**. Minneapolis-MN: University of Minnesota Press. p.67, 1981.

ROHLFS, E.M.; SHAHEEN, N.J.; SILVERMAN, L.M. Is the hemochromatosis gene a modifier locus for cystic fibrosis? *Genet Test*, v. 2, n. 1, p. 85-88, 1998.

ROMEO, G.; BIANCO, M.; DEVOTO, M.; MENOZZI, P.; MASTELLA, G.; GIUNTA, A.M.; MICALIZZI, C.; ANTONELLI, M.; BATTISTINI, A.; SANTAMARIA, F.; CASTELLO, D.; MARCHI, A.G.; MANCA, A.; MIANO, A. Incidence in Italy, genetic heterogeneity, and segregation analysis of cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*, v. 37, n. 2, p. 338-345, 1985.

ROMMENS, J.M.; IANNUZZI, M.C.; KEREM, B.; DRUMM, M.L.; MELMER, G.; DEAN, M.; ROZMAHEL, LR; 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*, v. 245, p. 1059-1065, 1989.

ROSENFELD, M.A.; YOSHIMURA, K.; TRAPNELL, B.C.; YONEYAMA, K.; ROSENTHAL, E.R.; DALEMANS, W.; FUKAYAMA, M.; BARGON, J.; STIER, L.E.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.; PERRICAUDET, M.; GUGGINO, W.B.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.P.; CRYSTAL, R.G. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*. v.68, p.143-145, 1992.

ROZMAHEL, R.; WILSCHANSKI, M.; MATIN, A.; PLYTE, S.; OLIVER, M.; AUERBACH, W.; MOORE, A.; FORSTNER, J.; DURIE, P.; NADEAU, J.; BEAR, C.; TSUI, L.C. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet*, v. 12, n. 3, p. 280-287, 1996.

RUSSO, M.P.; ROMEO, G.; DEVOTO, M.; BARBUJANI, G.; CABRINI, G.; GIUNTA, A.; D'ALCAMO, E.; LEONI, G.; SANGIUOLO, F.; MAGNANI, C. Analysis of linkage disequilibrium between different cystic fibrosis mutations and

three intragenic microsatellites in the Italian population. **Hum Mutat**, v. 5, n. 1, p. 23-27, 1995.

SAIKI, R.K.; BUGAWAN, T.L.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLADQ alfa DNA. **Nature**, v. 324, p. 163-166, 1988.

SALVATORE, F.; SCUDIERO, O.; CASTALDO, G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. **Am J Med Genet**, v. 111, n. 1, p. 88-95, 2002.

SALZANO, F.M.; FREIRE-MAIA, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1967. p. 1-44.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.; **Molecular Clonning. A laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor – NY : Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

SELANDER, P. The frequency of cystic fibrosis of the pancreas in Sweden. **Acta Paediatr**, v. 51, p. 65, 1962.

SHEPPARD, D.; OSTEDGAARD, L.; RICH, D.; WELSH, M. The amino-terminal portion of CFTR forms a regulated Cl-channel. **Cell**. v. 76, p.1091-1098, 1994.

SHOSANI, T.; AUGARTEN, A.; GAZIT, E.; BASHAN, N.; YAHAV, Y.; RIVLIN, Y.; TAL, A.; SERET, H.; YAAR, L.; KEREM, E.; KEREM, B. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Askenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. **Am J Hum Genet**, v. 50, p. 222-228, 1992.

SLATKIN, M.; RANNALA, B. Estimating the age of alleles by use of intraallelic variability. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 2, p. 447-458, 1997.

SLOMSKI, R.; SCHLOESSER, M.; BERG, L.; WAGNER, M.; KAKKAR, V.; COOPER, D.; REISS, J. Omission of exon 12 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts. **Hum. Genet**. v. 89, p.615-619, 1992.

STEINBERG, A.G.; BROWN, D.C. On the incidence of cystic fibrosis of the pancreas. **Am J Hum Genet**, v. 12, p. 416, 1960.

STEVENSON, A.C. The lode of hereditary defect in human populations. **Radiat Res Suppl**, v. 1, p. 306, 1959.

STRONG, T.V.; SMIT, L.S.; TURPIN, S.V.; COLE, J.L.; HON, C.T.; MARKIEWICZ, D.; PETTY, T.L.; CRAIG, M.W.; ROSENOW, E.C.; TSUI, S.C.; IANNUZZI, M.C.; KNOWLES, M.R.; COLLINS, F.S. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. **N Eng J Med**, v. 325, p. 1630-1634, 1991.

SULTZ, H.A.; SCHLESINGER, E.R.; MOSHE, W.E. The Erie County survey of long-term childhood illness. **Am J Public Health**, v. 56, n. 9, p. 1461-1469, 1966.

SUPER, M. Cystic fibrosis in Southern Africa. Including the preparation of a register of carriers and potential carriers. **S Afr Med J**, v. 54, n. 1, p. 18-21, 1978.

SUPER, M. Factors influencing the frequency of cystic fibrosis in South West Africa. **Monogr Paediatr**, v. 10, p. 106-113, 1979.

SUPER, M.; SCHWARZ, M.J.; MALONE, G. Screening for cystic fibrosis carriers. **Lancet**, v. 340, n. 8817, p. 490-491, 1992.

TABCHARANI, J.; CHANG, X.; RIORDAN, J.; HANRAHAN, J. Phosphorylation-regulate Cl⁻ in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. **Nature**. v. 352, p.628-631, 1991.

TAUSSIG, L.M. Cystic fibrosis. An Overview. In: TAUSSIG, L.M. **Cystic fibrosis**. New York: Thieme-Stratton, 1984. p. 1-9.

TEEM, J.L.; BERGER, H.A.; OSTEDGAARD, L.S.; RICH, D.P.; TSUI, L.C.; WELSH, M.J. Identification of revertants for the cystic fibrosis delta F508 mutation using STE6-CFTR chimeras in yeast. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 335-346, 1993.

THOMAS, P.J.; SHENBAGAMURTHI, P.; SONDEK, J.; HULLIHEN, J.M.; PEDERSEN, P.L. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. **J Biol Chem**. 1992 Mar 25;267(9):5727-30

THOMSON, M.W. Genetics of cystic fibrosis. In: STURGESS JM, ed. **Perspectives in cystic fibrosis**. Toronto: Canadian cystic fibrosis foundation, 1980. p. 281-291.

TIZZANO, E.; BUCHWALD, M. Recent advances in cystic fibrosis research. **J. Pediatr**. v. 122, p.985-988, 1993a.

TIZZANO, E.; CHITAYA, D.; BUCHWALD, M. Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. **Hum. Molec. Genet**. v.2, 219-224, 1993b.

TRAPNELL, B.; ZEITLIN, P.; CHU, C.; YOSHIMURA, K.; NAKAMURA, H.; GUGGINO, W.; BARGON, J.; BANKS, T.; DALEMANS, W.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.; CRYSTAL, R. Down regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester. **J. Biol. Chem.** v.266, p.10319-10323, 1991.

TREZISE, A.; BUCHWALD M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane regulator. **Nature.** v.353, p.434-437, 1991.

TREZISE, A.; CHAMBERS, J.; WARDLE, C.; GOULD, S.; HARRIS, A. Expression of cystic fibrosis gene in human fetal tissues. **Hum. Mol. Genet.** v.2, p.213-218, 1993.

TSUI L.C.; BUCHWALD, M.; BARKER, D.; BRAMAN, J.C.; KNOWLTON, R.; SCHUMM, J.W.; EIBERG, H.; MOHR, J.; KENNEDY, D.; PLAVSIC, N.; ZSIGA, M.; MARKIEVICZ, D.; AKOTS, G.; BROWN, V.; HELMS, C.; GRAVIUS, T.; PARKER, C.; REDIKER, K.; DONIS-KELLER, H. Cystic fibrosis locus defined a genetically linked polymorphic DNA marker. **Science**, v. 230, p. 1054-1057, 1985.

TSUI, L.C. Mutation and sequence variations detected in the cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) gene: a report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. **Hum Mut**, v. 1, p. 197-203, 1992.

TSUI, L.C.; EIBERG, H.; MOHR, J.; KENNEDY, D. The spectrum of cystic fibrosis mutations. **Trends in Genet**, v. 8, n. 11, p. 392-398, 1992.

TUCKER, S.; TANNAHILL, D.; HIGGINS, C. Identification and developmental expression of the *Xenopus laevis* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Hum. Mol. Genet.** v.1, p.77-82, 1992

VISICH, A.A.; BARREIRO, C.Z.; OPPLIGER, R.; CHERTKOFF, L.P. Characterization of 3 microsatellites of the cystic fibrosis gene in Argentine families **Medicina**, v. 61, n. 1, p. 23-27, 2001.

VIVELL, V.O.; JACOBI, H.; MÜNCHBACH, K. Zur Mucoviscidosis im Kindersalter. **Monatsschr Kinderheilkd**, v. 111, p. 62, 1963.

WAGNER, J.; COZENS, A.; SHULMAN, H.; GRUENERT, D.; STRYER, L.; GARDNER, P. Activation of chloride channels in normal cystic fibrosis airway epithelial cell by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. **Nature.** v.349, p.793-796, 1991.

WAINWRIGHT, B.J.; SCAMBLER, P.J.; SCHMIDTKE, J.; WATSON, E.A.; LAW, H.Y.; FARRAL, M.; COOKE, H.J.; EIBERG, H.; WILLIAMSON, R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cenq22. **Nature**, v. 318, p. 384-385, 1985.

WAINWRIGHT, B.J.; SCAMBLER, P.; STANIER, P.; WATSON, E.; BELL, G.; WICKING, C.; ESTIVILL, X.; COURTNEY, M.; BOUE, A.; PEDERSEN, P.; WILLIAMSON, R.; FARRAL, M. Isolation of a human gene with protein sequence similarity to human and murine int-1 and the *Drosophila* segment polarity wingless. **EMBO J.** v.7, p.1743-1748, 1988.

WALKER, D.; McCLOSKEY, D.; SINARD, L.; McINNES, R. Molecular analysis of human argininosuccinate lyase: mutant characterization and alternative splicing of the coding region. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 87, p.9625-9629, 1990.

WARWICK, W.J. The incidence of cystic fibrosis in Caucasian populations. **Helv Paediat Acta**, v. 33, n. 2, p. 117-125, 1978.

WATERS, D.L.; DORNEY, S.F.A.; GASKIN, K.J.; GRUCA, M.A.; O'HALLORAN, M.; WILCKEN, B. Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program. **N. Engl. J. Med.** v. 322, p.303-308, 1990.

WELSH, M.J.; SMITH, A.E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell**, v. 73, p. 1251-1254, 1993.

WELSH, M.J.; TSUI, L.C.; BOAT, T.F.; BEAUDET, A.L. Cystic fibrosis. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. e VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. v. 3, p. 3799-3876.

WHITE, M.B.; LEPPERT, M.; NIELSEN, D.; ZIELENSKI, J.; GERRARD, B.; STEWART, C.; DEAN, M. A de novo cystic fibrosis mutation: CGA (Arg) to TGA (stop) at codon 851 of the CFTR gene. **Genomics**, v. 11, n. 3, p. 778-779, 1991.

WHITE, R.; WOODWARD, W.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.O.; HOFF, M.; HERBST, F.; LALOUEL, F.M.; DEAN, M.; VANDEWONDE, G. A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. **Nature**. v.318, p.382-384, 1985.

WILL, K.; STUHRMANN, M.; DEAN, M.; SCHMIDTKE, J. Alternative splicing in the first nucleotide binding fold of CFTR. **Hum. Molec. Genet.** v.2, p.445-448, 1993.

WOOD, R.E.; BOAT, T.F.; DOERSHUK, C.F. Cystic fibrosis: State of the Art. **Am Rev Respir Dis**, v. 113, p. 833-878, 1976.

WRIGHT, S.W.; MORTON, N.E. Genetic studies on cystic fibrosis in Hawaii. **Am J Hum Genet**, v. 20, p. 157-169, 1968.

YANG, Y.; DEVOR, D.; ENGELHARDT, J.; ERNST, S.; STRONG, T.; COLLINS, F.; COHN, J.; FRIZZELL, A.; WILSON, J. Molecular basis of defective anion transport in L cells expressing recombinant forms of CFTR. **Hum Molec Genet**, v. 2, p. 1253-1261, 1993.

YOSHIMURA, K.; NAKAMURA, H.; TRAPNELL, B.; CHU, C.; DALEMANS, W.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.; CRYSTAL, R. Expression of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in cells of non-epithelial origin. **Nucleic Acid Res.** v.19, p.5417-5423, 1991a.

YOSHIMURA, K.; NAKAMURA, H.; TRAPNELL, B.; DALEMANS, W.; PAVIRANI, A.; LECOCQ, J.; CRYSTAL, R. The cystic fibrosis gene has a housekeeping-type promoter and is expressed at low levels in cell of epithelial origin. **J. Biol. Chem.** v.266, p.9140-9144, 1991b.

ZABNER, J.; COUTURE, L.; GREGORY, R.; GRAHAM, S.; SMITH, A.E.; WELSH, M. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. **Cell.** v.75, p.207-216, 1993.

ZABNER, J.; WELSH, M.J.; GRAHAM, S.M.; SMITH, A.E.; MOSCICKI, R.; WADSWORTH, S. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: Part A. Safety of dose and repeat administration in the nasal epithelium. Part B. Clinical efficacy in the maxillary sinus. **Hum Gene Ther**, v. 6, n. 2, p. 205-218, 1995a.

ZABNER, J.; FASBENDER, A.J.; MONINGER, T.; POELLINGER, K.A.; WELSH, M.J. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. **J Biol Chem**, v. 270, n. 32, p. 18997-19007, 1995b.

ZIELENSKI, J.; MARKIEWICZ, D.; RININSLAND, F.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C. A cluster of highly polymorphic dinucleotide repeats in intron 17b of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. **Am. J. Hum. Genet.** v.49, p.1256-1262, 1991a.

ZIELENSKI, J.; ROZMAHEL, R.; BOZON, D.; KEREM, B.; GRZELCZAK, Z.; RIORDAN, J.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. **Genomics.** v.10, 214-218, 1991b.

ZIELENSKI, J.; TSUI, L.C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. **Annu Rev Genetics**, v. 29, p. 777-807, 1995.

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1	TERMO DE ANUÊNCIA.....	147
APÊNDICE 2	PROTOCOLO CLÍNICO.....	151
APÊNDICE 3	PROTOCOLO DE ETNIAS DA FIBROSE CÍSTICA.....	152
APÊNDICE 4	HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/ <i>Ava</i> II, IVS17bTA, E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS MUTADOS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.....	153
APÊNDICE 5	HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS MUTADOS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.....	154
APÊNDICE 6	HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS NORMAIS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.....	155
APÊNDICE 7	DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS SEIS MARCADORES INTERNOS DO GENE CFTR EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DOS GRUPOS EURO-BRASILEIRO E AFRO-BRASILEIRO.....	156
APÊNDICE 8	HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA, SEM MUTAÇÃO ASSOCIADA, PRESENTES EM CROMOSSOMOS AFETADOS, DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.....	157

APÊNDICE 1 - TERMO DE ANUÊNCIA

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA

Titulo do Projeto: Análise da variabilidade genética do gene CFTR na população brasileira: *screening* completo dos 27 éxons do gene CFTR com identificação de mutações e suas associações com marcadores intra-gênicos em euro-brasileiros e afro-brasileiros.

Investigadores: Lodércio Culpi (041) 366-3144 (r. 254)
Universidade Federal do Paraná

Fábio Rueda Fauz (041) 366-3144 (r. 254)
Universidade Federal do Paraná

Propósito da Pesquisa

Atualmente já é conhecido que determinadas mutações no gene CFTR predispõe a quadros clínicos mais graves e outras a quadros clínicos mais leves. No Brasil existem dois grandes problemas com relação aos pacientes de fibrose cística: o primeiro é a demora no diagnóstico, o que dificulta o tratamento e que seria facilitado se técnicas de *screening* fossem mais rápidas e menos custosas, sendo que, se em todos os indivíduos que tivessem algum sintoma de fibrose cística fosse feito um rápido *screening*, provavelmente uma porcentagem relativa destes já teriam algum indício de se são ou não afetados FC, fazendo com que, em caso positivo, já fosse iniciado um tratamento mais específico; o segundo é que muitas vezes, não se sabem as mutações que determinados indivíduos afetados apresentam, o que impede um prognóstico futuro de como a doença vai se desenvolver e, conseqüentemente, de como este indivíduo deve ser tratado a fim de melhorar a sua qualidade vida. Este estudo pode facilitar o diagnóstico de FC e o *screening* de portadores. Também, a longo prazo, espera-se ser possível aplicar as informações obtidas nesta pesquisa para estudar o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar o tratamento da FC

Descrição da Pesquisa

Seus filhos serão questionados a respeito de doar uma amostra de sangue (aproximadamente 5ml). A amostra de sangue será coletada de acordo com os padrões clínicos, os quais raramente têm algum risco. Pode ocorrer algum pequeno desconforto quando a agulha é inserida na veia. O material genético (DNA) usado em nossa pesquisa será extraído a partir da amostra de sangue coletada, usando técnicas moleculares padrão em nosso laboratório. O DNA será usado para a análise molecular do gene CFTR.

Possíveis desconfortos ou inconveniências:

Não existe nenhum problema associado com a participação neste estudo. Existe somente um pequeno desconforto quando a agulha é inserida na veia. Pode ocorrer a formação de um pequeno hematoma na região da coleta, o qual desaparece em poucos dias.

Benefícios:

A informação obtida a partir desta pesquisa pode não beneficiar você ou os seus filhos diretamente, mas será utilizada para desenvolver um aprendizado geral da gravidade da FC e o relacionamento com outros problemas clínicos que ocorrem na doença. A longo prazo os resultados da pesquisa podem levar a novos métodos de cura para a FC.

Confidencialidade:

Confidencialidade será a respeito de não ocorrer divulgação de nenhuma informação sobre a identidade dos pacientes, não ocorrendo nenhuma publicação com identificação sem o consentimento do paciente. Para a informação do paciente, se este consentir, os novos dados serão inseridos nas suas fichas médicas. O material genético isolado como resultado desta pesquisa será estocado anonimamente.

Participação:

A participação na pesquisa é voluntária. Se você não quiser que seu filho participe da pesquisa neste momento e depois mudar de idéia. Poderá entrar no grupo a qualquer momento.

Consentimento :

Eu confirmo que os processos da pesquisa, descritos acima, foram explicativos para mim e que qualquer questão que eu tenha tido me foi respondida de forma satisfatória. Eu fui informado das alternativas da participação neste estudo, incluindo o direito de não participar. Também me foram explicados sobre os possíveis desconfortos, e também declaro ter entendido os benefícios se por acaso eu participar da pesquisa. Eu sei que obterei resposta a qualquer questão que eu tiver agora ou no futuro. Eu entendo que os dados obtidos a meu respeito serão mantidos em sigilo e que nenhuma informação sobre minha identidade pessoal será publicada sem minha prévia permissão, a menos que seja requerido por lei.

Eu consinto em participar.

	A pessoa que pode ser contatada sobre a pesquisa é:
<i>Nome e idade do paciente</i>	
	quem pode ser chamado ao telefone #:
<i>Assinatura (se for maior de 18 anos)</i>	
	Assinatura
<i>Nome da pessoa que deu o consentimento</i>	
	<i>Data</i>

Para os pais dos participantes com idade inferior a 18 anos uma forma de consentimento separada deve ser incluída.

Consentimento :

Eu confirmo que os processos da pesquisa, descritos acima, foram explicativos para mim e que qualquer questão que eu tenha tido me foi respondida de forma satisfatória. Eu fui informado das alternativas da participação neste estudo, incluindo o direito de não participar. Também me foram explicados sobre os possíveis desconfortos, e também declaro ter entendido os benefícios se por acaso eu participar da pesquisa. Eu sei que obterei resposta a qualquer questão que eu tiver agora ou no futuro. Eu entendo que os dados obtidos a meu respeito serão mantidos em sigilo e que nenhuma informação sobre minha identidade pessoal será publicada sem minha prévia permissão, a menos que seja requerido por lei.

Eu consinto que meu filho (a) _____ participe.

Nome do Pai / Mãe

A pessoa que pode ser contatada
sobre a pesquisa é:

Assinatura

quem pode ser contatado ao telefone #:

APÊNDICE 2 - PROTOCOLO CLÍNICO

Data: _____

Nome completo do paciente: _____

Endereço atual: _____

Idade atual: _____

Data de nascimento: _____

Sexo: _____

Grupo étnico: _____

Estado de nascimento: _____

Consangüinidade: _____

Parentes com FC: _____

Irmão com FC: _____

Idade aos primeiros sintomas: _____

Idade ao diagnóstico: _____

Ano do diagnóstico: _____

Íleo meconial: _____

Insuficiência pancreática: _____

Doença pulmonar: _____

Escore de Schwachman: _____

Cloro no suor: _____

Sódio no suor: _____

Data de óbito: _____

Médico responsável: _____

APÊNDICE 3 - PROTOCOLO DE ETNIAS DA FIBROSE CÍSTICA

DATA DE HOJE: _____

INVESTIGADOR PRINCIPAL: _____

NOME DO PACIENTE: _____

SOBRENOME: _____

ENDEREÇO ATUAL: Rua: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone para contato: _____

LOCAL DE NASCIMENTO:

Cidade: _____

Estado: _____

Região: _____

País: _____

MÃE DO PACIENTE:

Nome: _____

Sobrenome de solteira: _____

Descendência por parte de mãe: _____

Descendência por parte de pai: _____

PAI DO PACIENTE:

Nome: _____

Sobrenome: _____

Descendência por parte de mãe: _____

Descendência por parte de pai: _____

APÊNDICE 4 - HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS6aGATT, IVS8CA, IVS8-T(n), T854/Ava II, IVS17bTA, E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS AFETADOS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.

Grupo	Alelos						n	Frequência (%)	
	IVS6aGATT	IVS8CA	IVS8-T(n)	T854/Ava II	IVS17bTA	IVS17bCA			
	6	16	7	1	30	13	1	1,59	
	6	17	7	2	47	11	1	1,59	
	6	17	9	1	31	13	1	1,59	
	6	17	9	1	32	13	1	1,59	
	6	23	7	1	31	13	1	1,59	
	6	23	7	1	33	13	1	1,59	
	6	23	9	1	30	13	1	1,59	
	6	23	9	1	31	13	16	25,40	
	6	23	9	1	32	13	1	1,59	
	6	23	9	1	33	13	4	6,35	
	6	23	9	1	34	13	1	1,59	
	6	25	9	1	30	13	1	1,59	
	6	26	9	1	31	13	1	1,59	
Euro-brasileiro	7	16	7	2	7	17	2	3,17	
	7	16	7	1	24	13	3	4,76	
	7	16	7	1	25	13	1	1,59	
	7	16	7	1	31	13	2	3,17	
	7	16	7	1	31	14	1	1,59	
	7	16	7	1	32	13	1	1,59	
	7	16	7	1	34	13	1	1,59	
	7	16	7	1	44	13	1	1,59	
	7	16	7	1	45	13	1	1,59	
	7	16	7	1	48	13	1	1,59	
	7	16	9	1	24	13	1	1,59	
	7	16	9	1	31	14	1	1,59	
	7	16	9	2	7	17	1	1,59	
	7	17	7	1	31	13	5	7,94	
	7	17	7	1	33	13	1	1,59	
	7	17	7	1	41	13	1	1,59	
	7	17	7	2	7	17	1	1,59	
	7	17	9	1	31	13	3	4,76	
	7	17	9	2	7	17	2	3,17	
	7	17	9	2	31	13	1	1,59	
	7	23	9	1	31	13	1	1,59	
				Total				63	100,00
	Afro-brasileiro	6	23	9	1	31	13	3	75,00
6		25	9	1	31	13	1	25,00	
			Total				4	100,00	

FONTE: o autor

APÊNDICE 5 - HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS AFETADOS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS^a

grupo	Alelos			n	Frequência (%)	grupo	Alelos			n	Frequência (%)		
	IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA				IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA				
Euro-brasileiro	16	7	17	5	4,46								
	16	21	19	1	0,89								
	16	24	13	4	3,57								
	16	25	13	1	0,89								
	16	29	13	2	1,79								
	16	29	14	1	0,89								
	16	30	13	3	2,68		16	7	17	3	6,52		
	16	31	13	4	3,57		16	24	13	1	2,17		
	16	31	14	2	1,79		16	28	16	2	4,35		
	16	32	13	4	3,57		16	28	13	1	2,17		
	16	32	14	1	0,89		16	30	13	1	2,17		
	16	33	13	2	1,79		16	30/32	13	1 ^b	2,17		
	16	34	13	2	1,79		16	30/32	13	1 ^b	2,17		
	16	38	16	1	0,89		16	31	13	3	6,52		
	16	44	13	1	0,89		16	31	14	1	2,17		
	16	45	13	1	0,89		16	31	18	1	2,17		
	16	48	13	1	0,89		16	31	18	1	2,17		
	16	nd	13	1	0,89		16	33	13	3	6,52		
	17	7	17	3	2,68		16	42	13	1	2,17		
	17	30	13	2	1,79		16	45	13	1	2,17		
	17	31	13	24	21,43		16	7/34	17	1 ^c	2,17		
	17	32	13	7	6,25		16	nd	13	2	4,35		
	17	33	13	1	0,89		16/17	30/33	13/14	1 ^d	2,17		
	17	31/34	13	1	0,89		16/17	30/33	13/14	1 ^d	2,17		
	17	41	13	1	0,89		16/23	33	13	1 ^c	2,17		
	17	44	11	1	0,89		16/23	31	13	1 ^c	2,17		
17	47	11	1	0,89		17	7	17	4	8,70			
18	34	13	1	0,89		17	28	18	1	2,17			
18	35	13	2	1,79		17	31	13	1	2,17			
21	36	13	1	0,89		19	7/34	13	1 ^c	2,17			
23	30	13	1	0,89		22	22	17	1	2,17			
23	31	13	18	16,07		23	31	13	5	10,87			
23	32	13	1	0,89		23	35	13	1	2,17			
23	32	14	1	0,89		25	31	13	1	2,17			
23	33	13	5	4,46		16	7	17	3	6,52			
23	34	13	1	0,89		16	24	13	1	2,17			
23	46	13	1	0,89		nt	nt	nt	4	8,70			
25	30	13	1	0,89									
26	31	13	1	0,89									
Total					112	100,00	Total					46	100,00

FONTE: o autor

NOTA:

^a - inclui haplótipos presentes no apêndice 1

^{b - c - d - e} - são dois cromossomos do mesmo indivíduo, sendo que estes indivíduos apresentam apenas dois haplótipos e estes são distintos (por exemplo, no ^b um dos haplótipos tem o alelo 30 e o outro o alelo 32)

nd - não definido (por algum problema técnico não foi possível estabelecer o alelo)

"/" - não foi possível identificar o alelo (indica "ou")

nt - não tipado

APÊNDICE 6 - HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA PRESENTES EM CROMOSSOMOS NORMAIS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS.

grupo	Alelos			n	Frequência (%)	grupo	Alelos			n	Frequência (%)	
	IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA				IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA			
Euro-brasileiro	14	7	17	1	0,94	Euro-brasileiro (continuação)	21	31	13	1	0,94	
	14	31	13	2	1,89		21	36	13	2	1,89	
	14	43	13	1	0,94		23	19	22	1	0,94	
	14	46	13	1	0,94		23	22	17	1	0,94	
	15	7	17	2	1,89		23	30	13	1	0,94	
	15	31	13	1	0,94		23	31	13	1	0,94	
	16	7	13	1	0,94		23	33	13	1	0,94	
	16	7	17	13	12,26		23	35	13	2	1,89	
	16	8	17	1	0,94		23	nd	13	2	1,89	
	16	25	13	2	1,89		24	22	17	1	0,94	
	16	29	13	2	1,89		24	31	13	1	0,94	
	16	30	13	12	11,32		Total			106	100,00	
	16	31	13	11	10,38		Afro-brasileiro	16	7	16	1	3,13
	16	31	14	1	0,94			16	7	17	3	9,38
	16	32	13	7	6,60	16		24	13	1	3,13	
	16	33	14	1	0,94	16		25	13	1	3,13	
	16	34	13	1	0,94	16		29	13	1	3,13	
	16	35	13	1	0,94	16		29	14	1	3,13	
	16	44	13	2	1,89	16		30	13	3	9,38	
	16	45	13	1	0,94	16		31	13	1	3,13	
	16	46	13	3	2,83	16		32	13	3	9,38	
	16	47	14	1	0,94	16		34	13	1	3,13	
	16	nd	13	2	1,89	16		42	13	1	3,13	
	17	7	11	1	0,94	16		49	16	1	3,13	
	17	7	17	5	4,72	16		30/32	16	1	3,13	
	17	24	20	1	0,94	16		34/7	17	1	3,13	
	17	25	13	1	0,94	16		nd	17	1	3,13	
	17	29	13	1	0,94	16		nd	13	1	3,13	
	17	31	13	2	1,89	17		7	17	1	3,13	
	17	32	13	1	0,94	17		19	13	1	3,13	
	17	41	13	1	0,94	17		27	18	2	6,25	
	17	44	13	1	0,94	17		31	13	1	3,13	
17	46	11	1	0,94	21	36	13	1	3,13			
17	46	13	2	1,89	23	7	17	1	3,13			
17	47	11	1	0,94	23	31	13	2	6,25			
17	55	11	2	1,89	16/23	28	16	1	3,13			
18	32	13	1	0,94	Total			32	100,00			
18	36	13	1	0,94								

FONTE: o autor

NOTA: nd - não definido (não foi possível estabelecer o alelo)
 “/” - não foi possível identificar o alelo (indica “ou”)

APENDICE 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS SEIS MARCADORES INTERNOS DO GENE CFTR EM CROMOSSOMOS DE AFETADOS DOS GRUPOS EURO-BRASILEIRO E AFRO-BRASILEIRO

mutação	Alelo						n	Frequência (%)
	IVS6aGATT	IVS8CA	IVS8-T(n)	T854/ <i>Ava II</i>	IVS17bTA	IVS17bCA		
Y1092X	6	16	7	1	30	13	1	1,49
R553X	6	17	7	2	47	11	1	1,49
ΔF508	6	17	9	1	31	13	1	1,49
ΔF508	6	17	9	1	32	13	1	1,49
ΔF508	6	23	7	1	31	13	1	1,49
G542X	6	23	7	1	33	13	1	1,49
ΔF508	6	23	9	1	31	13	13	19,40
ΔF508 ^a	6	23	9	1	31	13	3	4,48
G542X	6	23	9	1	33	13	4	5,97
N1303K	6	23	9	1	31	13	3	4,48
G542X	6	23	9	1	32	13	1	1,49
G542X	6	23	9	1	34	13	1	1,49
N1303K	6	23	9	1	30	13	1	1,49
ΔF508	6	25	9	1	30	13	1	1,49
ΔF508	6	25	9	1	30	13	1	1,49
ΔF508 ^a	6	26	9	1	31	13	1	1,49
G85E	7	16	7	1	24	13	3	4,48
711+1G:T	7	16	7	1	25	13	1	1,49
2183 AA:G	7	16	7	1	31	13	2	2,99
2183 AA:G	7	16	7	1	31	14	1	1,49
R347P	7	16	7	1	32	13	1	1,49
R334W	7	16	7	1	34	13	1	1,49
A561E	7	16	7	1	44	13	1	1,49
1898-1G:A	7	16	7	1	45	13	1	1,49
R334W	7	16	7	1	48	13	1	1,49
1717-1G:A	7	16	7	2	7	17	1	1,49
3849+10kb C:T	7	16	7	2	7	17	1	1,49
G85E	7	16	9	1	24	13	1	1,49
1812-1G:A	7	16	9	1	31	14	1	1,49
ΔF508	7	16	9	2	7	17	1	1,49
R1162X	7	17	7	1	31	13	4	5,97
ΔF508	7	17	7	1	31	13	1	1,49
R334W	7	17	7	1	33	13	1	1,49
R334W	7	17	7	1	41	13	1	1,49
W1282X	7	17	7	2	7	17	1	1,49
ΔF508	7	17	9	1	31	13	3	4,48
W1282X	7	17	9	2	7	17	2	2,99
ΔF508	7	17	9	2	31	13	1	1,49
ΔF508	7	23	9	1	31	13	1	1,49
Total							67	100,00

FONTE: o autor

NOTA: ^a - mutações com haplótipos completos identificados na amostra afro-brasileira

APÊNDICE 8 - HAPLÓTIPOS PARA OS MARCADORES IVS8CA, IVS17bTA E IVS17bCA, SEM MUTAÇÃO ASSOCIADA, PRESENTES EM CROMOSSOMOS AFETADOS, DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS^a

grupo	Alelos			n	Frequência ¹ (%)	Frequência ² (%)
	IVS8CA	IVS17bTA	IVS17bCA			
Euro-brasileiro	14	7	17	1	7,14	0,89
	16	29	13	2	14,29	1,79
	16	30	13	2	14,29	1,79
	16	31	13	1	7,14	0,89
	16	32	13	3	21,43	2,68
	16	33	13	1	7,14	0,89
	16	34	13	1	7,14	0,89
	16	38	16	1	7,14	0,89
	18	35	13	2	14,29	1,79
		total			14	100,00
Afro-brasileiro	16	7	17	3	14,29	6,52
	16	24	13	1	4,76	2,17
	16	28	13	1	4,76	2,17
	16	30	13	1	4,76	2,17
	16	31	18	1	4,76	2,17
	16	33	13	1	4,76	2,17
	16	nd	13	2	9,52	4,35
	16	30/32	13	1 ^b	4,76	2,17
	16	30/32	13	1 ^b	4,76	2,17
	16	34/7	17	1 ^c	4,76	2,17
	16/17	30/33	13/14	1 ^d	4,76	2,17
	16/17	30/33	13/14	1 ^d	4,76	2,17
	16/23	31	13	1	4,76	2,17
	17	28	18	1	4,76	2,17
	19	34/7	13	1 ^c	4,76	2,17
	22	22	17	1	4,76	2,17
	23	31	13	1	4,76	2,17
nt	nt	nt	1	4,76	2,17	
	total			21	100,00	45,65

FONTE: o autor

NOTA:

¹ Frequência relativa apenas aos haplótipos presentes em cromossomos sem mutações identificadas.

² Frequência relativa a todos os haplótipos presentes em cromossomos de indivíduos afetados.

^a - inclui haplótipos presentes no apêndice 1

^{b - c - d} - são dois cromossomos do mesmo indivíduo, sendo que estes indivíduos apresentam apenas dois haplótipos e estes são distintos (por exemplo, no ^b um dos haplótipos tem o alelo 30 e o outro o alelo 32

nd - não definido (por algum problema técnico não foi possível estabelecer o alelo)

"/" - não foi possível identificar o alelo (indica "ou")

nt - não tipado