

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Sabrina Gonçalves

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA EM  
SANTA CATARINA: IDENTIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS  
MUTAÇÕES CFTR E DETERMINAÇÃO DO PERFIL  
MUTACIONAL DA POPULAÇÃO CATARINENSE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia. Área de Concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Celso Spada  
Co-orientadora: Dra. Maria Elizabeth Menezes

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Sabrina

Caracterização molecular da fibrose cística em  
Santa Catarina: identificação da frequência das  
mutações CFTR e determinação do perfil mutacional da  
população catarinense / Sabrina Gonçalves ;  
orientador, Celso Spada; coorientadora, Maria  
Elizabeth Menezes - SC, 2017.  
153 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Fibrose cística. 3. Perfil  
mutacional. 4. CFTR. 5. Frequência. I. Spada,  
Celso. II. Menezes, Maria Elizabeth . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“Caracterização molecular da Fibrose Cística em Santa Catarina: identificação da frequência das mutações CFTR e determinação do perfil mutacional da população catarinense”**

**POR**

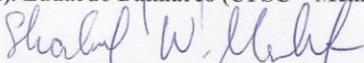
**Sabrina Gonçalves**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

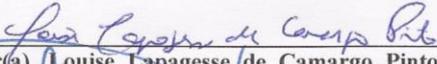
**Banca Examinadora:**

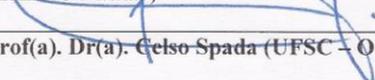
  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Solange Lúcia Blatt (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Eduardo Dalmarco (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Sharbel Weidner Maluf (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Carlos Frederico Tourinho (UNISUL – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Louise Lapagesse de Camargo Pinto (UNISUL – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Celso Spada (UFSC – Orientador)

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2017.



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha existência, por tudo que vivenciei, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada e, principalmente, por semear em mim o amor incondicional e a compreensão perante as adversidades.

Aos meus pais, Lisandro e Maria Inês, por minha vida, por representarem a bússola da minha existência e por tornarem possível tudo que sou.

Ao meu esposo Eduardo pelo apoio, companhia, incentivo e principalmente amor demonstrado em todos os momentos.

Ao professor, Celso Spada, por todos os seus ensinamentos, pela confiança, por todas as oportunidades, por direcionar minha busca pelo conhecimento e por me mostrar que a capacidade crítica pode caminhar junto com a humildade.

À minha coorientadora, Maria Elizabeth Menezes por acreditar em mim, por seus ensinamentos, incentivo e amizade.

Agradeço a colaboração da Dra. Louise Lapagesse de Camargo Pinto e do Dr. Norberto Ludwig Neto, da equipe multidisciplinar de Fibrose Cística do Hospital Infantil Joana de Gusmão, que possibilitaram a coleta das amostras necessárias para execução desta pesquisa.

À enfermeira Marta Winck do Ambulatório Interdisciplinar de Fibrose Cística do Hospital Infantil Joana de Gusmão, pelo apoio incondicional recebido.

À Dra. Marina Siebert e à professora Dra. Ursula Matte, do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, por me receber e me ajudar de forma tão generosa nas análises de sequenciamento de Nova Geração na Plataforma Ion Torrent.

Às sempre amigas do Teste do Pezinho, Rute Clari Prestes e Sandra de Moura Ghisi Rubi, por todo carinho e compreensão.

Ao LACEN/SC, em nome do diretor Winston Luiz Zomkowski e da gerente de Biologia Médica Cristine Ferreira, por todo o incentivo e por permitir o desenvolvimento deste trabalho.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Farmácia, por disponibilizar todo o suporte técnico.

A CAPES por tornar financeiramente possível a concretização desta etapa da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar minha formação profissional e humana e por não me fazer esquecer que o acesso à educação deve ser um direito inerente a todos.

A cada momento que fez parte desta maravilhosa experiência, por ter me transformado e por promover a busca incessante da transformação. A todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

*Sabrina Gonçalves*

Florianópolis, 2017.

*“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço”.*

*Dave Weinbaum*

*“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.*

*Louis Pasteur*



## RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é considerada a doença hereditária letal mais comum em populações de origem caucasiana. A doença se manifesta clinicamente com várias formas de gravidade, moduladas por diferentes genótipos e o meio ambiente. Aproximadamente 2.000 mutações já foram descritas, sendo que a frequência destas variam de população para população em função de diferenças étnicas e geográficas. Dentre as inúmeras mutações do gene *CFTR*, a F508del é tida como a mais frequente na população mundial (66%). Entretanto, no Brasil a frequência desta mutação é reduzida, aproximadamente 47%, e no Estado de Santa Catarina ainda é desconhecida. Neste sentido, a determinação da frequência e distribuição das mutações do gene *CFTR* no Estado de Santa Catarina é fundamental para poder implementar ou adaptar estratégias diagnósticas, de manejo e tratamento, das crianças e jovens catarinenses afetados pela doença. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o perfil mutacional do gene *CFTR* da população catarinense. Além disso, amostras de pacientes com diagnóstico clínico de FC foram utilizadas para padronizar e validar protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo *Allele Specific Oligonucleotide* (ASO). Adicionalmente, seis pacientes que previamente realizaram rastreio molecular com painel de 36 mutações foram submetidos ao sequenciamento. Foram identificadas 14 mutações, responsáveis por 69% dos alelos de FC em Santa Catarina: F508del (51,33%), G542X (4,87%), R334W (2,21%), R1162X (2,21%), N1303K (2,21%), 3120+1G>A (2,21%), *CFTR* dele2,3 (21 kb) (0,88%), R553X (0,44%), 1717-1G>A (0,44%), 2183AA>G (0,44%), I507del (0,44%), R1066C (0,44%), W1282X (0,44%), Y1092X (0,44%). Seis mutações (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K, 3120+1G>A) apresentaram frequência alélica superior a 1%, totalizando em conjunto 65,04% dos alelos caracterizados. Estas 6 mutações foram selecionadas para o rastreio molecular em 21 pacientes e representaram um excelente painel para o rastreio da FC em Santa Catarina, com um poder de detecção de 66,67%, aproximando-se ao poder de detecção de outras metodologias mais completas como painéis de mutações importados e sequenciamento gênico. A análise por painel de sequenciamento de 6 amostras de pacientes do presente estudo contribuiu para o diagnóstico definitivo da doença em 3 casos e possibilitou a identificação de um alelo mutado em um paciente. Portanto, além de ser uma técnica laboriosa e com elevado custo por análise, é inapropriada para detectar mutações raras, pois as mutações de FC não são igualmente distribuídas

entre as diferentes populações. Desta forma, os resultados obtidos com a presente pesquisa, além de possibilitarem a determinação do perfil mutacional do gene *CFTR* na população catarinense, também foram de extrema importância para a implementação de uma nova estratégia de rastreio molecular da FC em Santa Catarina, com eficiência diagnóstica e rapidez. Tal abordagem permitirá uma contribuição diagnóstica ao teste do suor e possibilitará a criação de uma diretriz que auxilie no manejo ambulatorial e tratamento dos acometidos pela doença.

**Palavras-chave:** fibrose cística, perfil mutacional, CFTR, frequência, PCR-ASO.

## ABSTRACT

The Cystic fibrosis (CF) is considered the most common inherited lethal disease at the Caucasian population. There are various forms of severity of CF modulated by different genotypes and the environment. Approximately 2,000 mutations have already been described, the frequency of which varies from population to population due to ethnic and geographical differences. Among the many mutations of the CFTR gene, F508del is considered the most frequent in the world population (66%). However, in Brazil the frequency of this mutation is reduced, approximately 47%, and in the State of Santa Catarina it is still unknown. In this context, the determination of the frequency and distribution of CFTR gene mutations in the State of Santa Catarina is fundamental to be able to implement or adapt diagnostic, management and treatment strategies of Santa Catarina children and young people affected by the disease. Thus, the objective of the present study was to determine the mutational profile of the CFTR gene of the population of Santa Catarina. In addition, samples of patients with clinical diagnosis of CF were used to standardize and validate Allele Specific Oligonucleotide (ASO) polymerase chain reaction (PCR) protocols. In addition, 6 patients who previously performed molecular screening with a panel of 36 mutations were submitted to sequencing. Fourteen mutations, responsible for 69% of CF alleles in Santa Catarina, were identified: F508del (51.33%), G542X (4.87%), R334W (2.21%), R1162X (2.21%), N1303K (2.21%), 3120 + 1G> A (2.21%), CFTR dele2.3 (21 kb) (0.88%), R553X (0.44%), 1717-1G> 44% (0.44%), 2183AA> G (0.44%), I507del (0.44%), R1066C (0.44%), W1282X (0.44%), Y1092X (0.44%). Six mutations (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K, 3120 + 1G> A) presented allele frequencies higher than 1%, totaling 65.04% of the alleles. These 6 mutations were selected for molecular screening in 21 patients and represented an excellent panel for the screening of CF in Santa Catarina, with a detection power of 66.67%, approaching the power of detection of other more complete methodologies such as Panels of imported mutations and gene sequencing. Sequencing panel analysis of 6 patient samples from the present study contributed to the definitive diagnosis of the disease in 3 cases and allowed the identification of a mutated allele in a patient. Therefore, in addition to being a laborious technique and with a high cost per analysis, it is inappropriate to detect rare mutations, since the mutations of CF are not equally distributed among the different

populations. In this way, the results obtained with the present project, besides making possible the determination of the mutational profile of the CFTR gene in the population of Santa Catarina, were also extremely important for the implementation of a new strategy for the molecular tracing of CF in Santa Catarina, with diagnostic efficiency and speed. Such an approach will allow a diagnostic contribution to the sweat test and will enable the creation of a guideline that assists in the outpatient management and treatment of those affected by the disease.

**Key words:** cystic fibrosis, mutational profile, CFTR, frequency, ASO-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gene *CFTR*, proteína CFTR e sua posição na célula.  
Fonte: Adaptado de ZIELENSKI e TSUI, 1995.....29
- Figura 2.** Estrutura da proteína CFTR e seu posicionamento na célula.  
Fonte: LUBAMBA et al., 2012.....30
- Figura 3.** Mecanismos associados aos níveis elevados de NaCl no suor de pacientes com FC.  
Fonte: Adaptado de ROWE et al., 2005.....31
- Figura 4.** Estratégias utilizadas para o rastreio neonatal – IRT/IRT e IRT/DNA  
Fonte: Adaptado de KLOOSTERBOER et al., 2009.....44
- Figura 5.** Desenho dos TestStrips.  
Fonte: Adaptado do manual de uso do kit CF StripAssay® (Vienna Lab).....69
- Figura 6.** Distribuição das 6 mutações de maior frequência sobre o total de alelos de FC identificados no Estado de Santa Catarina.....74
- Figura 7.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v).....78
- Figura 8.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v).....79
- Figura 9.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v).....79
- Figura 10.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v).....80
- Figura 11.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v).....81
- Figura 12.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação das mutações G542X, 3120+1G>A, R334W, N1303K e R1162X em gel de agarose 2% (p/v).....82

<b>Figura 13.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação G542X em gel de agarose 2% (p/v).....	83
<b>Figura 14.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação G542X em gel de agarose 2% (p/v).....	83
<b>Figura 15.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R334W em gel de agarose 2% (p/v).....	84
<b>Figura 16.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R334W em gel de agarose 2% (p/v).....	85
<b>Figura 17.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação N1303K em gel de agarose 2% (p/v).....	85
<b>Figura 18.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação N1303K em gel de agarose 2% (p/v).....	86
<b>Figura 19.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R1162X em gel de agarose 2% (p/v).....	86
<b>Figura 20.</b> Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R1162X em gel de agarose 2% (p/v).....	87
<b>Figura 21.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para o controle negativo (paciente sem as mutações F508del, G542X, R334W, N1303K, R1162X e 3120+1G>A).....	88
<b>Figura 22.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 11, 18 e 35, heterozigotos compostos para as mutações F508del/G542X.....	89
<b>Figura 23.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 1 e 20, heterozigotos compostos para as mutações F508del/R334W.....	90
<b>Figura 24.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para o paciente 21, heterozigoto composto para as mutações F508del/N1303K.....	91

<b>Figura 25.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para o paciente 16, heterozigoto composto para as mutações F508del/R1162X.....	92
<b>Figura 26.</b> Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 6, 17 e 34, negativos para a mutação 3120+1G>A e heterozigotos para a mutação F508del.....	93
<b>Figura 27.</b> Imagem da área de carregamento do chip contendo as microesferas ( <i>Ion Sphere Particles</i> - ISP) com os <i>pools</i> de amplicons...	98
<b>Figura 28.</b> Rendimento das microesferas ( <i>Ion Sphere Particles</i> - ISP) geradas.....	99
<b>Figura 29.</b> Distribuição dos tamanhos das leituras geradas.....	100



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Categorias e classes de mutações do gene <i>CFTR</i> .....	36
<b>Tabela 2.</b> Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR-ASO para a mutação F508del.....	63
<b>Tabela 3.</b> Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação F508del.....	63
<b>Tabela 4.</b> Programa de PCR-ASO para a realização do gradiente de temperatura no termociclador DA-7600 (mutação F508del).....	64
<b>Tabela 5.</b> Tamanho do produto dos iniciadores utilizados na PCR-ASO para as mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A..	65
<b>Tabela 6.</b> Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação G542X, R334W, R1162X e N1303K.....	66
<b>Tabela 7.</b> Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação 3120+1G>A.....	66
<b>Tabela 8.</b> Programa de PCR-ASO para a realização do gradiente de temperatura no termociclador DA-7600 (mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A).....	67
<b>Tabela 9.</b> Descrição da frequência alélica das mutações identificadas nos pacientes com fibrose cística atendidos no HIJG.....	73
<b>Tabela 10.</b> Descrição da frequência genotípica das mutações identificadas nos pacientes com fibrose cística atendidos no HIJG.....	75
<b>Tabela 11.</b> Resultados da quantificação e grau de pureza das amostras de DNA avaliadas pelo equipamento NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific).....	76
<b>Tabela 12.</b> Resultados da quantificação e grau de pureza das amostras que se encontravam fora do intervalo da razão A260/A280.....	77

<b>Tabela 13.</b> Participantes da pesquisa, rastreamento molecular previamente realizado e resultado do teste genético.....	95
<b>Tabela 14.</b> Genótipos definidos com 5 mutações.....	96
<b>Tabela 15.</b> Frequência alélica das 5 mutações nos pacientes analisados.....	97
<b>Tabela 16.</b> Qualidade de alinhamento das reads.....	101
<b>Tabela 17.</b> Alterações detectadas nas 6 amostras analisadas por sequenciamento.....	101
<b>Tabela 18.</b> Comparação dos resultados obtidos com o painel 36 mutações e sequenciamento dos 6 pacientes incluídos no estudo.....	102

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1.** Investigação molecular da mutação F508del no gene *CFTR* após Triagem Neonatal positiva.  
Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004.....41
- Fluxograma 2.** Delineamento experimental do estudo retrospectivo....57
- Fluxograma 3.** Delineamento experimental do estudo prospectivo.....58
- Fluxograma 4.** Etapas envolvidas no processo de sequenciamento.....72



## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i> <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ACOG	
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQ	<i>Alignment Quality</i>
ARMS	Sistema de Mutação Refratária à Amplificação
ASO	<i>Allele Specific Oligonucleotide</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Citosina
CG	Complexo de Golgi
CFF	<i>Cystic Fibrosis Foundation</i> <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFTR	
CFTR1	<i>Cystic Fibrosis Mutation Database</i>
CFTR2	<i>Clinical and Functional Translation of CFTR</i>
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance
dHPLC	
EUA	Estados Unidos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FC	Fibrose Cística
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
H <sup>+</sup>	Íons de Hidrogênio
IRT	Tripsina Imunorreativa
ISFET	<i>Ion-Sensitive field-effect transistor</i>
ISP	<i>Ion Sphere Particles</i>
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina

MBL2	<i>Mannose-Binding Lectin 2</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mM	Milimolar
MSD	Domínio Transmembrana
NBD	Domínios de Ligação de Nucleotídeo
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
p/v	Peso/volume
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
QF-PCR	<i>Quantitative Fluorescent multiplex PCR</i>
R	Domínio Regulatório Citoplasmático
RE	Retículo Endoplasmático
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotações por Minuto
SSCP	Análise de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples
T	Timina
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1</i>
T <sub>m</sub>	Temperatura de Melting
TNF- $\alpha$	<i>Tumour Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
U	Unidade
UV	Ultravioleta
VEP	<i>Variant Effect Predictor</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	27
2.1	Descrição e dados epidemiológicos .....	27
2.2	Gene CFTR e sua proteína .....	28
2.3	Mutações associadas à fibrose cística .....	32
2.4	Correlação entre genótipo e fenótipo .....	37
2.5	Terapias específicas de mutação .....	39
2.6	Diagnóstico .....	40
2.6.1	<i>Triagem Neonatal</i> .....	41
2.6.2	<i>Teste do Suor</i> .....	44
2.6.3	<i>Análise Molecular</i> .....	46
3	JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO .....	51
4	OBJETIVOS .....	53
	Objetivo geral.....	53
	Objetivos específicos.....	53
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
5.1	Aspectos éticos.....	51
5.2	Delineamento experimental .....	55
5.3	Critérios de inclusão.....	59
5.4	Critério de exclusão .....	59
5.5	Casuística .....	59
5.5.1	<i>População do Estudo Prospectivo</i> .....	59
5.5.2	<i>Grupo Controle</i> .....	59
5.6	Análise das amostras .....	60
5.6.1	<i>Extração do DNA</i> .....	60
5.6.2	<i>Quantificação e grau de pureza do DNA</i> .....	61
5.6.3	<i>Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA</i> .....	62
5.6.4	<i>Padronização da PCR-ASO para identificação das mutações F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G&gt;A</i> .....	62
5.6.5	<i>Validação da técnica de PCR-ASO e comparação dos resultados obtidos com os do HIJG</i> .....	67
5.6.6	<i>Sequenciamento de Nova Geração</i> .....	70
6	RESULTADOS .....	73

6.1	Estudo retrospectivo .....	73
6.2	Estudo prospectivo.....	76
6.2.1	<i>Determinação da concentração, grau de pureza e integridade do DNA genômico.....</i>	76
6.2.2	<i>Padronização da técnica de PCR-ASO para detecção da mutação F508del. ....</i>	78
6.2.3	<i>Padronização da técnica de PCR-ASO para detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G&gt;A.....</i>	81
6.2.4	<i>Detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G&gt;A.....</i>	82
6.2.5	<i>Reprodutibilidade inter-ensaio dos resultados .....</i>	88
6.2.6	<i>Panorama do rastreamento com as mutações F508del, G542X R334W, N1303K, R1162X e 3120+1G&gt;A.....</i>	94
6.2.7	<i>Sequenciamento de Nova Geração.....</i>	97
6.2.7.1	<i>Controle de Qualidade e desempenho.....</i>	97
6.2.7.2	<i>Alterações Encontradas .....</i>	101
7	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	103
7.1	Estudo retrospectivo .....	103
7.2	Painel de 6 mutações.....	107
7.3	Sequenciamento .....	109
8	PERSPECTIVAS.....	115
	REFERÊNCIAS.....	117

ANEXO 1 – Comprovantes da aprovação do projeto de pesquisa no comitê de ética em pesquisa com seres humanos.....	135
ANEXO 2 – Artigo publicado em revista.....	148
ANEXO 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ....	149
ANEXO 4 – Marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec®).....	151
ANEXO 5 – Delineamento experimental do estudo retrospectivo e resultados .....	152
ANEXO 6 – Delineamento experimental do estudo retrospectivo e resultados .....	153

## 1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é considerada a doença hereditária letal mais comum em populações de origem caucasiana (FRANCKX et al., 2015). Sua incidência varia entre os países e grupos étnicos, atingindo um caso para cada 2.683 caucasianos nascidos vivos na Europa e um caso para cada 3.500 nascidos vivos nos Estados Unidos (RUEEGG et al., 2013; CFF, 2015).

No Brasil, não existem estudos epidemiológicos abrangentes que permitam estimar a incidência nas regiões (LEMOS et al, 2004), porém um estudo no Rio Grande do Sul evidenciou que a estimativa da incidência de FC chega a um caso para cada 1.587 indivíduos, ou seja, é tão frequente quanto na Europa e América do Norte (RASKIN et al., 2008).

Nas últimas décadas, a sobrevida dos pacientes fibrocísticos tem aumentado consideravelmente em decorrência do diagnóstico precoce, proporcionado pela triagem neonatal, associado à boa adesão ao tratamento (ALVAREZ et al., 2004; SANTOS et al., 2005). Nos Estados Unidos (EUA), por exemplo, a sobrevida média do acometido pela FC é de 38 anos (CFF, 2015) e no Brasil, segundo o Registro Brasileiro de FC, 2014, a mediana de sobrevida é de 37,7 anos.

Neste contexto, o rastreamento neonatal obrigatório que foi recomendado pelo Ministério da Saúde em 2001, através da dosagem sérica da tripsina imunorreativa (IRT), tornou-se um marco importante para FC no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Entretanto, é uma estratégia de rastreio da doença e não de diagnóstico. Nos casos positivos, os neonatos são encaminhados para realizar o teste diagnóstico definitivo (FARREL et al., 2008; BOROWITZ et al., 2009).

O diagnóstico confirmatório da FC é realizado pelo teste do suor, que pode apresentar erros de interpretação e contribuir para falsos resultados (LEGRYS et al., 2007). Além do teste do suor, a pesquisa da mutação mais comum, a F508del, também é utilizada na confirmação do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Entretanto, estudos mostram que a frequência da mutação F508del é reduzida no Brasil, provavelmente em decorrência da maior miscigenação racial e da existência de perfis mutacionais particulares para as diferentes regiões do país (CABELLO et al., 2003; OKAY et al., 2005).

Tendo em vista estes aspectos, fica clara a necessidade de reestruturar a estratégia de diagnóstico molecular para FC para permitir

uma contribuição diagnóstica ao teste do suor e desenvolver novas estratégias de manejo e tratamento dos pacientes fibrocísticos catarinenses no intuito de proporcionar uma melhor qualidade de vida e aumento da sobrevida dos acometidos. Neste sentido, o conhecimento do perfil mutacional da população catarinense é o princípio crucial para o desenho e aplicação de qualquer nova estratégia em prol de avanços diagnósticos e terapêuticos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIÇÃO E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A FC ou mucoviscidose é uma doença genética com padrão de herança autossômica recessiva, crônica, progressiva e com manifestações sistêmicas (ZIELENSKI, 2000; RATJEN e DORING, 2003). Afeta cerca de 30.000 crianças e adultos nos EUA e 70.000 no mundo todo (CFF, 2015). Sua incidência varia de acordo com a etnia do país ou região, ocorrendo preferencialmente em indivíduos caucasianos (RASKIN et al., 2008; FEREC e CUTTING, 2012).

Embora a FC seja mais incidente em caucasianos (1:2.500), é uma doença pan-étnica (ZVEREFF et al., 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incidência de FC na Europa é de aproximadamente um caso em cada 2.000 nascimentos, sendo que na Irlanda, Itália e França a incidência oscila entre 1:1.800 e 1:2.400 (WHO, 2015). No sul da África, 1 em cada 42 pessoas são carreadoras da FC e a incidência é estimada em 1:7.000 indivíduos (FEREC e CUTTING, 2012). Na Ásia, embora a FC seja subdiagnosticada, evidências sugerem que a doença seja rara apresentando uma incidência de 1:350.000 (WHO, 2015).

Na América Latina, a composição étnica da população é heterogênea. Em países como Uruguai e Argentina, cerca de 90% da população é de origem caucasóide, enquanto em outros como, por exemplo, México, Colômbia e Chile, 57 a 87% são mestiços. A incidência de FC nestes países varia de 1:4.000 a 1:10.000 nascidos no Chile e México, respectivamente (O'SULLIVAN e FREEDMAN, 2009; FIRMIDA e LOPES, 2011).

Nos EUA a prevalência é de um caso em cada 3.500 nascimentos e no Brasil, embora a prevalência ainda não tenha sido mapeada, alguns estudos epidemiológicos estimam entre 1:16.275 e 1:13.073 nascidos vivos (NUNES et al., 2013; WHO, 2015).

Contudo, a incidência na região sul do Brasil assemelha-se a da população caucasiana da Europa (1:2.000) e América do Norte (1:2.500) (ZVEREFF et al., 2014; WHO, 2015), sendo observado 1:1.587 indivíduos no Rio Grande do Sul e 1:6.803 no Paraná (RASKIN et al., 2008). Em Santa Catarina, a estimativa de incidência é de 1:6.800 (PTN-SC, 2016). Dentre os Estados da região sul o Rio Grande do Sul

destaca-se por possuir a mais alta incidência, isso implica que 1:20 habitantes é heterozigoto para FC (RASKIN et al., 2008).

Em outras regiões do Brasil a incidência diminui para cerca de um caso em cada 10.000 nascidos vivos (RIBEIRO et al., 2002; SANTOS et al., 2005), sendo que em Minas Gerais e São Paulo a incidência diminui ainda mais, cerca de 1:21.277 e 1:32.258, respectivamente (RASKIN et al., 2008). A variação de incidência encontrada entre as regiões é decorrente, principalmente, da maior descendência européia na região sul e de afrodescendentes na região sudeste (OKAY et al., 2005; RASKIN et al., 2008; PERONE et al., 2010).

Em relação à expectativa de vida dos pacientes fibrocísticos, estudos realizados nos EUA revelaram que a sobrevida média dos pacientes afetados em 1980 foi de 20 anos e em 1996, de 31,3 anos (SANTANA et al., 2003; ALVAREZ et al., 2004). Segundo informações da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), em 2006 a expectativa de vida dos fibrocísticos dos EUA alcançou 36,9 anos e em 2010 chegou há 38,3 anos (CFF, 2015).

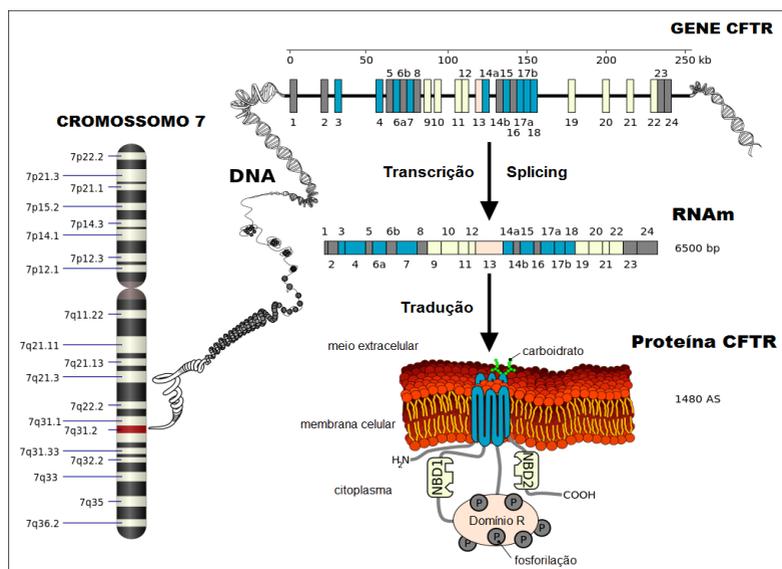
No Brasil, estudos mostraram que a expectativa média de vida dos pacientes fibrocísticos no período de 1979 a 1989 foi de 6,4 anos, aumentado para 12,6 anos no período de 1970 a 1994 (REIS et al., 1998) e atingindo 18,4 anos no período de 1990 a 2000 (ALVAREZ et al., 2004). Em 2014, o Registro Brasileiro de FC publicou que a mediana de sobrevida foi de 37,7 anos.

Segundo Reis e colaboradores (2000), os avanços no diagnóstico e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas têm elevado a expectativa de vida dos pacientes com FC. Além destes fatores, o desenvolvimento de centros de referência para o diagnóstico e o tratamento precoce da FC também contribui para aumentar as taxas de sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (ROSA et al., 2008).

## 2.2 GENE *CFTR* E SUA PROTEÍNA

A FC é causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) localizado no braço longo do cromossomo 7, *locus* q31, sendo dividido em 27 éxons e representando cerca de 5% do DNA genômico (REIS e DAMACENO, 1998; DAVIS, 2006). Além disso, é constituído de aproximadamente 250 kb e é

responsável pela codificação de uma proteína de 1.480 aminoácidos, denominada CFTR (Figura 1) (ZIELENSKI e TSUI, 1995).

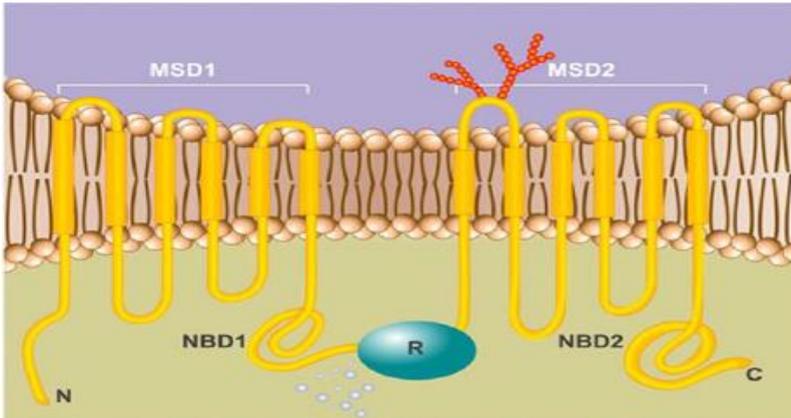


**Figura 1.** Gene *CFTR*, proteína CFTR e sua posição na célula.  
Fonte: Adaptado de ZIELENSKI e TSUI, 1995.

A CFTR é uma glicoproteína sintetizada no núcleo, que sofre maturação em organelas citoplasmáticas, localizando-se na membrana apical das células epiteliais de diversos órgãos, como intestino grosso, trato respiratório, tecidos reprodutivos, pele, pâncreas, glândulas sudoríparas e fígado. Ademais, é uma proteína transmembrana dependente de ATP que funciona como um canal de cloro, mantendo o equilíbrio eletrolítico da célula, favorecendo o transporte de íons cloro para o meio extracelular e a inibição da entrada de íons sódio para o meio intracelular (HUFFMYER et al., 2009; LUBAMBA et al., 2012).

A proteína CFTR é membro da superfamília dos transportadores ABC e é formada por dois domínios transmembrana hidrofóbicos (MSD), cada um com 6 segmentos, dois domínios de ligação de nucleotídeo (NBD) e um domínio regulatório citoplasmático (R) que contém múltiplos sítios-alvo para fosforilação por proteínas quinases (Figura 2). As caudas amino e carboxo-terminal são orientadas para o

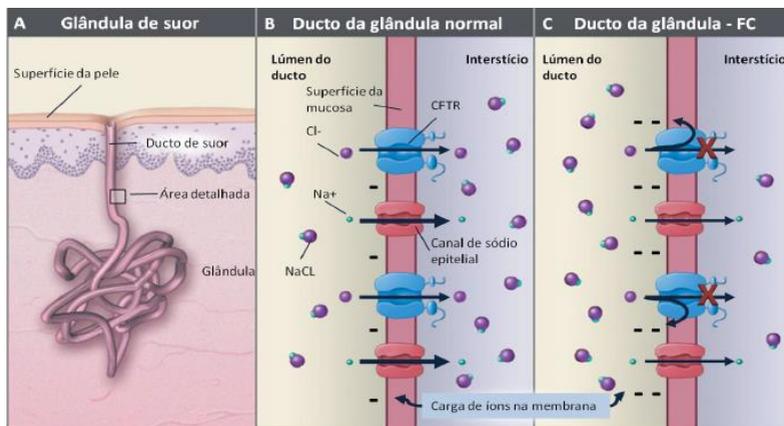
citoplasma e atuam como mediadores da interação entre CFTR e uma ampla variedade de proteínas ligantes (ZIELENSKI, 2000; LI e NAREN, 2005; ROWE et al., 2005).



**Figura 2.** Estrutura da proteína CFTR e seu posicionamento na célula.  
Fonte: LUBAMBA et al., 2012.

Na FC a proteína CFTR está ausente no epitélio ou apresenta alterações qualitativas e quantitativas em seu nível de expressão, o que confere às células epiteliais impermeabilidade ao cloro. Desta forma, a diminuição da secreção de cloro e o aumento excessivo da reabsorção do sódio alteram a composição do muco secretado pelas células epiteliais (BIEGER et al., 2012; LUBAMBA et al., 2012).

As consequências da perda de função da proteína CFTR variam de acordo com os tecidos envolvidos. Nas glândulas sudoríparas, a CFTR normal funciona reabsorvendo o cloro do lúmen da glândula. Quando defeituosa, o cloro deixa de ser reabsorvido ficando em concentrações elevadas no lúmen. Como a CFTR também regula os canais de sódio, quando está defeituosa, o cloro não é reabsorvido e o sódio, devido à hiperatividade dos canais de sódio, é hipersecretado fazendo com que o cloro e o sódio sejam encontrados em concentrações elevadas no suor, levando ao conhecido “suor salgado” encontrado nos pacientes (ROWE et al., 2005). O funcionamento da proteína CFTR na glândula de suor pode ser observado na figura 3.



**Figura 3.** Mecanismos associados aos níveis elevados de NaCl no suor de pacientes com FC. Ductos de suor (**Painel A**) em pacientes com FC diferem daqueles em pessoas sem a doença na capacidade de reabsorção de  $\text{Cl}^-$  antes do suor ser liberado na superfície da pele. A principal via de absorção de  $\text{Cl}^-$  é através da proteína CFTR, inserida na membrana plasmática do lúmen das células que revestem o ducto (**Painel B**). A diminuição da reabsorção de cloro e a alteração no transporte de sódio levam a diferença de potencial transepitelial elevada por todo ducto de suor, e o lúmen se torna carregada negativamente devido à falha da reabsorção do  $\text{Cl}^-$  (**Painel C**). O resultado é que o fluxo de NaCl total diminui acentuadamente, levando ao teor de sal aumentado. A espessura das setas corresponde ao grau de movimento de íons.

Fonte: Adaptado de ROWE et al., 2005.

Em outros órgãos, como o pulmão e o pâncreas, a CFTR normal atua secretando o cloro e não o reabsorvendo como ocorre nas glândulas sudoríparas (HULL, 2003). Portanto, o funcionamento da CFTR defeituosa, provoca um acúmulo do íon cloro dentro da célula, causando aumento do fluxo de sódio através dos canais de sódio, com o objetivo de manter o equilíbrio eletroquímico interno da célula (REIS e DAMACENO, 1998).

A combinação da diminuição da secreção do íon cloro, pela ausência ou mau funcionamento da CFTR, e do aumento da reabsorção de sódio e água, através dos canais de sódio, resulta na diminuição do líquido de superfície das vias aéreas, conduzindo à desidratação das secreções respiratórias e ao aumento de sua viscosidade. Essa alteração

da viscosidade do muco, principalmente no epitélio pulmonar e pancreático, causa obstrução nos ductos de ambos os órgãos, propiciando um ambiente favorável para infecções (RIBEIRO et al., 2002; BIEGER et al., 2012).

### 2.3 MUTAÇÕES ASSOCIADAS À FIBROSE CÍSTICA

As mutações do gene *CFTR* podem ocorrer pela substituição de nucleotídeo (*missense*), deleção de pares de bases, inserção ou deleção de uma base na sequência do DNA resultando em deslocamento do códon de leitura durante a tradução (*frameshift*), formação de um códon de parada prematuro (*nonsense*) ou alteração do local de *splicing* (LUBAMBA et al., 2012; CFTR1, 2015). As mutações do gene *CFTR* encontram-se localizadas ao longo de toda a região codificante do gene, nos íntrons e no promotor, porém, são comuns nos domínios de ligação de nucleotídeos e no domínio regulador da proteína (ROWNTREE e HARRIS, 2003).

Em todo mundo, menos de 20 mutações *CFTR* apresentam uma frequência superior a 0,1%, sendo que estas frequências variam entre diferentes regiões geográficas e grupos étnicos (BRODLIE et al., 2015). A mutação F508del é a mutação *CFTR* mais comum na população caucasiana, sendo encontrada em aproximadamente dois terços dos indivíduos diagnosticados com FC (FEREC e CUTTING, 2012). Entretanto, a frequência relativa da mutação F508del tem uma variabilidade grande entre diferentes regiões geográficas e distintos grupos étnicos. Na Europa, esta mutação apresenta um evidente gradiente na sua frequência, variando de 100% em ilhas da Dinamarca a 24,5% na Turquia (BOBADILLA et al., 2002; FEREC e CUTTING, 2012). Nas populações nativas da África e Ásia a F508del está ausente, embora exista com uma frequência considerável em populações mistas, tais como os afro-americanos (BARTOSZEWSKI et al., 2010).

A mutação F508del consiste na deleção de 3 pares de base (CTT) no éxon 10, resultando na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (BIEGER et al., 2012; LUBAMBA et al., 2012). Esta deleção da fenilalanina impede a migração da proteína para o ápice da membrana celular, mantendo-a retida no citoplasma celular, no complexo de Golgi (CG) e no retículo endoplasmático (RE). A ausência da proteína na membrana celular proporciona um fenótipo

grave da doença, marcado por insuficiência pancreática (FEREC e CUTTING, 2012; BRODLIE et al., 2015).

Desde a identificação do gene *CFTR*, em 1989, quase 2.000 mutações já foram descritas, segundo o site *Cystic Fibrosis Mutation Database*, destas, a mutação F508del apresenta a maior frequência mundial (66% dos casos) seguida das mutações G542X (2,4%), G551D (1,6%), N1303K (1,3%) e W1282X (1,2%) (CFTR1, 2015).

Em estudo realizado nos EUA, além da alta frequência observada da mutação F508del, presente em 75% dos casos, outras mutações encontram-se presentes: G542X (3,4%), W1282X (3,1%), G551D (2,4%), N1303K (1,8%), R117H (1,3%) e 3120+1G>A (1,2%) (STROM et al., 2011). Segundo Bobadilla e colaboradores (2002), a elevada frequência da mutação F508del pode ser atribuída à forte origem européia da população (BOBADILLA et al., 2002).

No entanto, no Brasil, a frequência da mutação F508del tem se mostrado variável de estado para estado. Segundo Raskin e colaboradores (1993) a frequência da mutação F508del foi de 49% no Rio Grande do Sul, 27% em Santa Catarina, 44% no Paraná, 52% em São Paulo e 53% em Minas Gerais (RASKIN et al., 1993). Em estudo similar, conduzido no Rio de Janeiro, a frequência da mutação F508del foi de 30,68% (CABELLO et al., 1999).

No Brasil há uma frequência reduzida da mutação F508del em comparação as taxas mundiais e aquelas registradas em países europeus e norte-americanos, provavelmente em decorrência da maior miscigenação racial e da existência de perfis mutacionais particulares para as diferentes regiões do país (ALVAREZ et al., 2004; OKAY et al., 2005).

Neste contexto, ao longo dos anos pesquisas realizadas no Brasil, nas regiões sul e sudeste, mostraram as seguintes frequências mutacionais: F508del (47%), G542X (5,5%), N1303K (2,6%), R553X (0,8%) e G551D (0,2%) (RASKIN et al., 1993). Enquanto, no Estado do Pará, região norte do Brasil, o perfil mutacional apresentou a seguinte particularidade: F508del (22,7%) e G551D (3%) (ARAÚJO et al., 2005), ressaltando que a frequência das mutações da FC, assim como sua incidência, varia entre as diferentes regiões e populações do Brasil (OKAY et al., 2005).

Além destes perfis mutacionais peculiares de cada região do país, estima-se que aproximadamente 73% dos alelos mutantes da FC

permaneçam não caracterizados indicando que outras mutações podem estar envolvidas nestes perfis (CABELLO et al., 2003).

De acordo com a funcionalidade da proteína, as mutações do gene *CFTR*, foram organizadas em sete classes, as quais associam a gravidade da mutação em relação ao fenótipo do paciente (Tabela 1). As mutações pertencentes às classes I, II, III e VII são consideradas graves e as das classes IV, V e VI moderadas (RATJEN, 2009; CULLING e OGLE, 2010; BRODLIE et al., 2015; DE BOECK e AMARAL, 2016).

Classe I: pertencem a esta classe todas as mutações que impedem a transcrição do gene *CFTR* em seu RNA mensageiro (RNAm) completo. As mutações *nonsense*, *frameshift* e que alteram o local de *splicing* são as mais encontradas nesta classe (FEREC e CUTTING, 2012). A mutação mais frequente é a G542X, que produz um códon de término da transcrição. Ocorre formação de transcritos instáveis e ou proteínas aberrantes que são reconhecidas por proteínas chaperonas no RE e rapidamente degradadas. Desta forma, não se observa proteína CFTR ativa na membrana (VANKEERBERGHEN et al., 2002; BELCHER e VIJ, 2010; CULLING e OGLE, 2010; BRODLIE et al., 2015). Outras mutações pertencem a esta classe como R1162X, R553X e W1282X (ROWE et al., 2005).

Classe II: as mutações que pertencem a esta classe estão associadas com um processamento anormal da proteína CFTR, pois bloqueiam os eventos pelos quais a proteína se torna madura, impedindo que esta chegue à membrana e assuma sua correta conformação (KREINDLER, 2010). As proteínas imaturas traduzidas ficam retidas no RE e, portanto, não passam para o CG para serem glicosiladas, havendo uma falha de proteínas funcionais na membrana. Estas proteínas anormais saem diretamente do RE para o citosol para serem degradadas no proteossoma (BRODLIE et al., 2015). Devido à ausência de proteínas na membrana, as mutações (F508del, N1303K e G85E) desta classe estão associadas a fenótipos de FC graves (BELCHER e VIJ, 2010; CULLING e OGLE, 2010).

Classe III: nesta classe as mutações causam uma regulação anormal do canal de cloro, portanto, ocorre o amadurecimento e posicionamento da proteína na membrana celular, mas não seu funcionamento. As mutações interferem na fosforilação do domínio regulatório (R) e por consequência na hidrólise de ATP nos domínios de ligação aos nucleotídeos (NBD), necessários para a ativação do canal (ROGAN et al., 2011; BRODLIE et al., 2015). Nesta classe estão

incluídas as mutações G551D, G551S, G1244E e G1349D (CULLING e OGLE, 2010).

Classe IV: as mutações associadas a esta classe incluem os casos em que o gene codifica uma proteína CFTR que é corretamente traduzida, processada, transportada e inserida na membrana apical e que responde a estímulos, contudo, a condutância de cloro é reduzida. Estas mutações estão localizadas nas regiões correspondentes aos vários segmentos transmembrana (MSD), alterando a condutância e/ou as propriedades de transporte do canal de cloro (BELCHER e VIJ, 2010; BRODLIE et al., 2015). Assim, quando existe uma mutação desta classe, há uma diminuição do fluxo iônico. Nesta classe se enquadram as mutações R117H, R334W, R337P, G314E (KREINDLER, 2010; FEREC e CUTTING, 2012).

Classe V: a proteína se encontra em quantidade reduzida, porém ativa (VANKEERBERGHEN et al., 2002; BELCHER e VIJ, 2010). Nesta classe se incluem mutações nas regiões promotoras que reduzem a transcrição, alterações de nucleotídeos que promovem *splicing* alternativo do transcrito da CFTR e substituições de aminoácidos que causam maturação protéica ineficiente (BRODLIE et al., 2015). Dentro dessa classe, podem ser citadas as mutações A455E, P574H e 3849+10KbC>T (FEREC e CUTTING, 2012; BRODLIE et al., 2015).

Classe VI: inclui as mutações que diminuem a estabilidade da proteína CFTR, tais como mutações *nonsense* ou *frameshift* que causam a deleção dos últimos 70-98 pb da zona C-terminal da proteína e mutações que afetam a regulação de outros canais (ZIELENSKI, 2000; KREINDLER, 2010). As mutações desta classe são responsáveis pelo *turnover* acelerado e precoce da proteína na superfície celular (ROWE et al., 2005; BRODLIE et al., 2015). Pertence a esta classe as mutações Q1412X e 4326delTC (CULLING e OGLE, 2010).

Atualmente se tem descrito a sétima classe de mutação que está associada a fenótipos graves da FC por causar ausência do RNAm, entretanto, os mecanismos que contribuem para a falta de RNAm e conseqüentemente ausência da proteína CFTR ainda não estão esclarecidos. A CFTR del2,3 (21 kb) e a 1717-1G>A são exemplos de mutações de classe VII (DE BOECK e AMARAL, 2016).

**Tabela 1.** Categorias e classes de mutações do gene *CFTR*.

<b>Classe da mutação</b>	<b>Efeito na via metabólica</b>	<b>Efeito na proteína CFTR</b>	<b>Exemplo de mutações</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>I</b>	Ausência de proteína CFTR na membrana apical	Defeito na síntese	G542X R1162X R553X W1282X	Mutação sem sentido, <i>frameshift</i> ou em sítio de <i>splicing</i>
<b>II</b>	Ausência de proteína CFTR na membrana apical	Defeito no tráfego até a membrana ou processamento anormal	F508del N1303K 3905insT G85E	Mutações de sentido trocado ou deleção de aminoácidos
<b>III</b>	Proteína CFTR em quantidade normal na membrana apical, porém não funcional	Defeito na regulação	G551D R553G R560T	Mutações de sentido trocado
<b>IV</b>	Proteína CFTR em quantidade normal na membrana apical, porém parcialmente funcional	Redução na condutância	R334W R117H R347P	

<b>V</b>	Proteína CFTR em quantidade reduzida na membrana apical	Redução na síntese/tráfego	2789 +5G/A IVS8-5T A455E	Mutações de sentido trocado ou em sítio de <i>splicing</i>
<b>VI</b>	Proteína CFTR presente na membrana apical, porém instável	Redução da estabilidade	4326delTC 4279ins A Q1412X	Mutações em sentido ou <i>frameshift</i>
<b>VII</b>	Ausência de proteína CFTR na membrana apical	Ausência de RNAm	CFTR dele2,3 (21 kb) 1717-1G>A	

Fonte: Adaptado de CULLING e OGLE, 2010; DE BOECK e AMARAL, 2016.

## 2.4 CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO

A FC é uma doença altamente heterogênea, com uma considerável variabilidade na gravidade e velocidade de progressão nos diferentes órgãos. Apesar da classificação das mutações fornecerem informações acerca da gravidade da mutação, não podem ser consideradas como o único fator para previsão de prognóstico (CASTELLANI et al., 2009). A grande variabilidade clínica associada à presença de heterozigotos compostos dificulta o estabelecimento da correlação entre genótipo e fenótipo (FAUCZ et al., 2007).

Dentre as várias manifestações clínicas, a função pancreática demonstra a maior correlação com as características genotípicas (MOSKOWITZ et al., 2008; BRENNAN e SCHRIJVER, 2016). Em geral, pacientes com insuficiência pancreática são homozigotos ou heterozigotos compostos para duas mutações graves (classes I, II e III) (SLIEKER et al., 2005). Enquanto, pacientes com uma ou duas

mutações das classes IV, V e VI (mutações moderadas) têm função pancreática suficiente (RATJEN et al., 2009).

Além da insuficiência pancreática, os pacientes homozigóticos ou heterozigóticos compostos para mutações graves tendem a apresentar elevada frequência de íleo meconial, mortalidade prematura, deterioração precoce e grave da função respiratória, maior incidência de desnutrição, doença hepática grave, altos níveis de cloro no suor e infertilidade masculina. Ao passo que indivíduos portadores de pelo menos uma mutação moderada, apresentam geralmente, doença pulmonar moderada, baixos níveis de cloro no suor, diagnóstico tardio e expectativa de vida maior (MCKONE et al., 2006; ROWNTREE e HARRIS, 2003; BRENNAN e SCHRIJVER, 2016). Normalmente, as mutações moderadas são fenotipicamente dominantes quando ocorrem em combinação com as mutações graves, favorecendo um quadro clínico mais brando (CASTELLANI et al., 2008).

Em estudo realizado na Holanda observou-se que doentes heterozigóticos nos quais foram evidenciadas mutações F508del/A455E apresentavam uma melhor função pulmonar que os pacientes homozigóticos F508del/F508del. Estes resultados mostraram que a mutação A455E (classe V) causa uma forma de doença pulmonar menos severa que a mutação F508del (WELSH e SMITH, 1993). Entretanto, foi observado que existem pacientes homozigóticos para F508del que apresentam insuficiência pancreática e outros que apresentam um funcionamento normal (KRISTIDIS et al., 1992).

A heterogeneidade fenotípica da FC, observada em indivíduos com genótipos semelhantes, sugere que existem mais fatores envolvidos na determinação do fenótipo que vai além do fator genótipo *CFTR*, como por exemplo, fatores ambientais (estado socioeconômico, tabaco, outros poluentes e exposições infecciosas) e outros modificadores genéticos (GRAVINA et al., 2015).

Estudos demonstraram que genes envolvidos no processo da inflamação, atuam como modificadores da doença pulmonar na FC (ROWNTREE e HARRIS, 2003). Neste sentido, Coutinho et al. (2014) verificaram associação entre gene *tumour necrosis factor  $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* ) com a doença pulmonar grave, Arkwright et al. (2000) encontraram relação entre o gene *transforming growth factor  $\beta$ 1* (*TGF- $\beta$ 1*) com o rápido declínio da função pulmonar e Rowntree e Harris (2003) também verificaram que variantes alélicas do gene *mannose-binding lectin 2* (*MBL2*) estão relacionadas com a gravidade da doença pulmonar na FC.

## 2.5 TERAPIAS ESPECÍFICAS DE MUTAÇÃO

Os tratamentos atualmente disponíveis, como os mucolíticos, antimicrobianos na forma inalatória e antiinflamatórios sistêmicos tem aumentado a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes fibrocísticos. No entanto, não tratam do defeito básico, ou seja, a ausência da proteína CFTR funcional (SLOANE e ROWE, 2010).

Neste sentido, novos medicamentos prometem dar suporte complementar às terapias disponíveis, agindo na modulação da proteína CFTR através do tipo de mutação (BRENNAN e SCHRIJVER, 2016).

Dentre os novos fármacos disponíveis está o Ataluren, anteriormente chamado de PTC124, age principalmente nas mutações de classe I. Este fármaco permite a leitura do RNA mensageiro pelo ribossoma, que não identifica as mutações, levando à formação de uma proteína funcional com troca de apenas um aminoácido (RATJEN, 2009). Segundo a *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF), 2015, o Ataluren vem apresentando resultados promissores na modulação da CFTR do epitélio respiratório de adultos e crianças, entretanto, é um fármaco que ainda se encontra em fase três de estudo clínico (FLUME e VAN DE VANTER, 2012; CFF, 2015).

Outra estratégia terapêutica que está sendo utilizada com êxito na modulação da proteína CFTR é o VX-770 ou ivacaftor. Este fármaco aumenta o tempo de fosforilação dos canais CFTR defeituosos (mutações de classe III) permitindo que permaneçam abertos, com isso o fluxo de cloro e bicarbonato aumentam através das membranas apicais (ERLINGER, 2011). Ensaio clínico de fase três com o ivacaftor em pacientes adultos e pediátricos, que apresentavam a mutação G551D, mostraram melhora expressiva nas funções pulmonares e em outros sintomas da FC, incluindo aumento de massa corporal e redução nas taxas de exacerbação pulmonar (FLUME e VAN DE VANTER, 2012; BRODLIE et al., 2015; EGAN, 2016). Com base nestes resultados, o ivacaftor foi primeiramente aprovado em 2012 para uso em adultos e crianças acima de 6 anos com a mutação G551D. Em decorrência dos bons resultados obtidos, em março de 2015 a *Food and Drug Administration* (FDA) também aprovou o uso do ivacaftor no tratamento de crianças de 2 a 5 anos de idade e com outras mutações relacionadas: G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D e R117H (CFF, 2015).

Além dos fármacos citados, o lumacaftor, também conhecido como VX-809, é outra opção terapêutica que tenta resgatar a atividade da proteína CFTR. O objetivo deste fármaco é facilitar o movimento da proteína mutante CFTR (mutações de classe II), permitindo-lhe escapar da degradação pelo retículo endoplasmático e encaminhando-a para a superfície da célula (BRODLIE et al., 2015). Ensaios clínicos de fase três com o lumacaftor em combinação com o ivacaftor, em pacientes homocigotos para F508del, mostraram melhora significativa nas funções pulmonares e em outros sintomas da FC (EGAN, 2016).

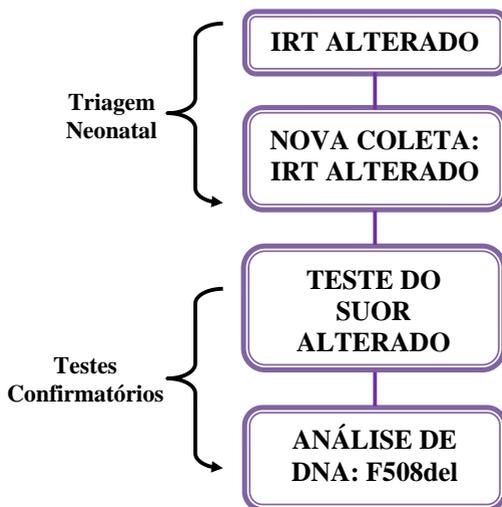
Mesmo com estes progressos na terapêutica da FC, poucos ensaios clínicos se destinam a corrigir o defeito básico, refletindo o baixo impacto que estas abordagens ainda têm na clínica (CFF, 2015; BRENNAN e SCHRIJVER, 2016). Entretanto, as mais recentes terapias dirigidas para a correção do defeito básico, que estão em fase de teste, dependem do conhecimento prévio da mutação responsável e representam um marco para o tratamento efetivo da FC e outras doenças genéticas (BRODLIE et al., 2015; EGAN, 2016). Neste sentido, o mapeamento das mutações próprias de cada população permitirá aos pesquisadores investigarem terapias personalizadas, proporcionando aos acometidos melhor qualidade de vida (CABELLO et al., 2003; DOULL, 2016).

## **2.6 DIAGNÓSTICO**

O diagnóstico de FC deve ser estabelecido rapidamente de forma a providenciar aconselhamento genético e tratamento apropriado aos doentes. A FC é diagnosticada na presença de pelo menos um achado clínico (como doença sinusopulmonar crônica, manifestações gastrointestinais e nutricionais, síndromes perdedoras de sal e anormalidades urogenitais), história familiar de FC (que ocorre em cerca de 20% dos casos) ou teste de triagem neonatal alterado, acompanhado de evidência laboratorial de disfunção da proteína CFTR (teste do suor alterado) ou pela identificação de duas mutações causadoras de FC (DALCIN e ABREU, 2008; FARRELL et al., 2008).

Conforme estabelecido pelo Ministério da Saúde (portaria 822 de 06/06/2001), através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), Santa Catarina ficou apta para detectar mutações no gene

CFTR. Os indivíduos que apresentam IRT positivo e teste de suor alterado são encaminhados para a investigação molecular da mutação F508del no gene CFTR, conforme fluxograma 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).



**Fluxograma 1.** Investigação molecular da mutação F508del no gene *CFTR* após Triagem Neonatal positiva.

Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004.

### 2.6.1 Triagem Neonatal

Com a ampliação das doenças pesquisadas pelo PNTN em 2001, a FC passou a ser rastreada, no Brasil, pelo “teste do pezinho”, através da dosagem do IRT (NUNES et al., 2013). O Estado do Paraná foi pioneiro na realização da triagem neonatal para FC (2001), seguido por Santa Catarina (2002) e Minas Gerais (2003) (SANTOS et al., 2005; PERONE et al., 2010).

A dosagem do IRT deve ser realizada na primeira semana de vida dos neonatos com FC, pois avalia a integridade da função pancreática. O IRT é um precursor da enzima pancreática, cuja concentração sérica nos fibrocísticos atinge níveis entre 5 a 10 vezes os valores normais. O aumento desta enzima na circulação é ocasionado

pela fibrose pancreática, que a maioria dos recém-nascidos apresenta no período intrauterino, levando a um refluxo das enzimas pancreáticas para a circulação e aumento dos níveis de IRT (NUNES et al., 2013; BREWINGTON e CLANCY, 2016).

A interpretação do resultado do IRT para FC na triagem neonatal no Estado de Santa Catarina é estabelecida com ponto de corte de 70 ng/ml em sangue total (NUNES et al., 2013). Portanto, a presença de níveis elevados de IRT em um primeiro exame indica que é necessário um segundo teste para confirmação. Este segundo exame deve ser realizado em até 30 dias de vida do recém-nascido. Após este período, o IRT tende a baixar sua concentração e normalizar, dificultando a suspeita e o diagnóstico da FC (CABELLO et al., 2003; SANTOS et al., 2005; FARREL et al., 2008; DALCIN e ABREU, 2008).

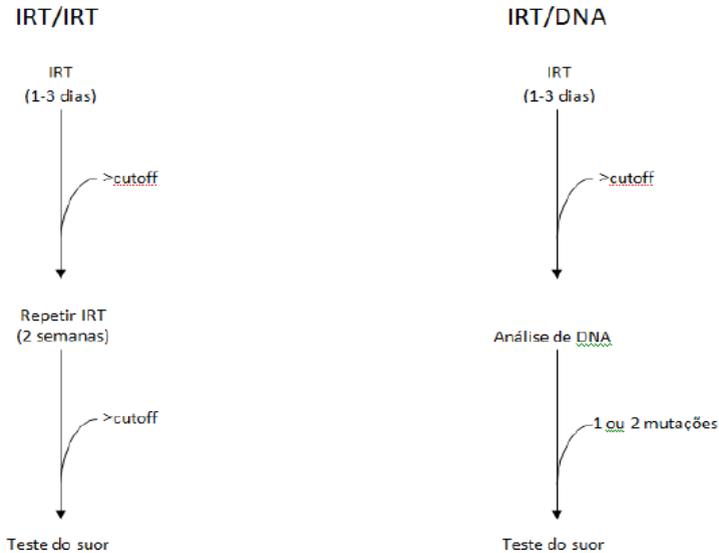
Um dos problemas relacionados com a utilização da dosagem de IRT é a falta de consenso relativamente ao valor normal. O número de falsos negativos depende do ponto de corte escolhido. Se o ponto de corte do IRT for elevado, existe um risco aumentado de ocorrer resultados falsos negativos. Pelo contrário, com um valor limite baixo, maior é o risco de existir falsos positivos (PARAD e COMEAU, 2003). O valor de 70 ng/ml correspondente ao percentil 99,8 estabelecido por Hammond et al. (1991) e confere ao teste sensibilidade de aproximadamente 90% e uma especificidade de 98% (HAMMOND et al., 1991; SANTOS et al., 2005). Entretanto, a especificidade deste exame pode se apresentar baixa, variando de 32 a 74%, dependendo dos pontos de corte estipulados pelos laboratórios (FOLESCU e COHEN, 2011).

Além da FC, outras condições fisiológicas ou médicas estão relacionadas com o aumento do IRT no período neonatal como as trissomias 13 e 18, a agenesia de ductos pancreáticos, as infecções congênitas, a obstrução intestinal e os casos de diabetes (SANTOS et al., 2005; CASTELLANI et al., 2009). Baseado nestes aspectos, as taxas de falso-positivos obtidas na dosagem do IRT têm se mostrado elevadas com valores entre 5 e 10% (SOUZA et al., 2002). Entretanto, a repetição do exame nos primeiros 30 dias de vida da criança reduz o número de falso-positivos em torno de 90% (SANTOS et al., 2005). Por outro lado, os falso-negativos estão associados à coleta tardia, visto que os valores de IRT tendem a declinar após a terceira semana de vida, mesmo em crianças afetadas. Nestes casos, as taxas de falso-negativos obtidas na

dosagem do IRT se encontram em torno de 20% (SOUZA et al., 2002; CABELLO et al., 2003).

O IRT está aumentado mesmo em crianças com mutações pertencentes às classes IV ou V e associadas à insuficiência pancreática (O'SULLIVAN e FREEDMAN, 2009). Neste sentido, em alguns países a estratégia de rastreio neonatal pode apresentar duas fases (Figura 4): na primeira, realiza-se o IRT numa amostra de sangue seco; na segunda, repete-se o IRT numa amostra de sangue fresco recolhido após 1-2 semanas de idade (IRT/IRT), ou realiza-se um teste de DNA para a mutação F508del ou múltiplas mutações (IRT/DNA) (MOSKOWITZ et al., 2008; CULLING e OGLE, 2010). Entretanto, o rastreio IRT/DNA sugere uma melhor sensibilidade que o algoritmo IRT/IRT por possibilitar a obtenção de um resultado específico com o reconhecimento das mutações do gene *CFTR* (SOUTHERN et al., 2007).

Em países desenvolvidos como o Canadá, que utiliza a estratégia de rastreio neonatal IRT/DNA, aproximadamente 59% dos pacientes fibrocísticos são diagnosticados no primeiro ano de vida e 67% até os 2 anos de idade (CANADIAN CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2016). Enquanto, no Brasil aproximadamente 56% dos casos são diagnosticados até o primeiro ano de vida e 61% até os 2 anos de idade (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014), mostrando a grande contribuição da triagem neonatal baseada no algoritmo IRT/IRT para a detecção da FC. Neste contexto, em 2014, segundo o Registro Brasileiro de FC, 70% do total de casos de FC foram diagnosticados por triagem neonatal.



**Figura 4.** Estratégias utilizadas para o rastreio neonatal – IRT/IRT e IRT/DNA

Fonte: Adaptado de KLOOSTERBOER et al., 2009.

Desta forma, a detecção precoce da FC, proporcionado pela triagem neonatal é importante para a profilaxia das infecções pulmonares nos recém-nascidos, para a reposição das enzimas pancreáticas, crescimento normal, diminuição das complicações resultantes da doença e para o aumento da expectativa de vida (BREWINGTON e CLANCY, 2016). No entanto, a triagem neonatal é um método de rastreamento da doença e não de diagnóstico. Nos casos positivos, os recém-nascidos são encaminhados para realizar exame confirmatório (teste do suor) (RATJEN e DORING, 2003; ROSENFELD et al., 2016).

## 2.6.2 Teste do Suor

O teste confirmatório de FC, padrão ouro no Brasil, é o teste do suor com precisão superior a 90%. O teste do suor raramente é normal

em pacientes homocigotos para o gene da FC (DOMINGOS et al., 2015). Este teste é uma análise quantitativa de eletrólitos no suor e mantém-se como a chave de investigação que sustenta o diagnóstico de FC. As indicações para o teste do suor incluem: fenótipo sugestivo de FC, história familiar e seguimento de alguns testes de rastreio populacional (GREEN e KIRK, 2007).

Embora várias técnicas tenham sido criadas para a coleta e medição de eletrólitos do suor, o método mais confiável é baseado na estimulação por iontoforese pela pilocarpina, também denominada de método clássico de Gibson e Cooke (REIS e DAMACENO, 1998). Entretanto, é uma técnica laboriosa que requer a determinação do peso exato do suor através de balança analítica e o cuidado para evitar a evaporação do mesmo durante a coleta, além da amostra de suor necessitar ser submetida à análise bioquímica dos eletrólitos, técnica também relativamente complexa. Por esse método, deve-se colher um mínimo de 50 mg de suor (idealmente  $\geq 75$  mg) para se obter um resultado acurado (MATTAR et al., 2010). A incidência de erros, neste procedimento, está entre 10 e 15% com maior porcentagem de falso-positivos, mas também de falso-negativos (BARRETO e PEREIRA, 2004).

A maioria dos erros é atribuída a profissionais inexperientes e sem treinamento especializado na coleta e análise do suor, no entanto, algumas falhas que ocorrem no teste do suor podem ser ocasionadas por problemas fisiológicos ou patologias de outra natureza, resultando tanto em falso-positivos quanto falso-negativos (BEAUCHAMP e LANDS, 2005; LEGRYS et al., 2007; MASTELLA, 2010).

Neste sentido, o teste do suor pode ser falso-positivo na insuficiência adrenal não tratada, displasia ectodérmica, hipoparatiroidismo, hipotireoidismo, diabetes insípido nefrogênico, deficiência de glicose 6-fosfatase, síndrome nefrótica, doença de Von Gierke, fucosidose, colestase familiar, pseudo-hipoaldosteronismo, mucopolissacaridose, pan-hipopituitarismo. Bem como pode se apresentar falso-negativo nos seguintes casos: em lactentes com hipoproteinemia, edema e que fazem uso de mineralocorticoides, coleta e análise de quantidade insuficiente de suor e outros problemas técnicos (LEIGH, 2004; BEAUCHAMP e LANDS, 2005).

Quanto aos valores de referência do método, o resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior que 60 mEq/l. Os níveis considerados normais são abaixo de 30mEq/l e limítrofes estão

entre 31 e 59 mEq/l. Pela gravidade da doença e pelo prognóstico reservado da mesma, o diagnóstico de FC somente poderá ser confirmado com dois testes positivos, realizados em momentos distintos (FARRELL et al, 2008; FARRELL et al., 2017).

Com base nestes fatos, qualquer um dos critérios clínicos, se acompanhado por níveis de cloro no suor acima de 60 mEq/l, seria suficiente para confirmar o diagnóstico de FC. Porém, por motivos técnicos, o teste é usualmente realizado somente após o segundo mês de vida do recém-nascido, mesmo quando há forte suspeita clínica (BARRETO e PEREIRA, 2004; MASTELLA, 2010). Por isso, apesar da urgência do resultado, o diagnóstico do neonato não pode ser confirmado neste período (MATTAR et al., 2010).

Em 97 a 98% dos pacientes fibrocísticos o teste do suor é patológico, entretanto, 4 a 5% pode apresentar níveis limítrofes entre 40 e 60 mEq/l ou normais, o que também dificulta o diagnóstico e acaba em interpretações incorretas (BARRETO e PEREIRA, 2004). Neste aspecto, é importante ressaltar que o teste do suor normal ou limítrofe não exclui o diagnóstico de formas atípicas de FC e, por isso deverá ser confirmado em outras técnicas (RIBEIRO et al, 2002).

Diante do exposto, presume-se que a taxa de subdiagnóstico de FC no Brasil é alta, e isso decorre, em parte, da complexidade que envolve a realização do teste do suor, da pouca quantidade de profissionais especializados para tal realização no nosso meio e também da ausência de equipamentos para a realização adequada do teste (MATTAR et al., 2010).

### **2.6.3 Análise Molecular**

A análise molecular pode ser realizada por métodos de análise direta do gene *CFTR*, através da detecção de mutações causadoras de FC. Uma grande variedade de técnicas é utilizada para a identificação de variações na sequência do gene *CFTR*, não havendo um padrão estabelecido (DEQUEKER et al., 2009).

Os kits comerciais disponíveis permitem detectar as mutações causadoras de FC mais frequentes na população caucasiana (DE BOECK et al., 2005). A maioria destas mutações é recomendada pelo *American College of Medical Genetics (ACMG)* e pelo *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)*, sendo as outras

específicas de determinadas populações. Neste contexto, os kits comerciais apresentam alta especificidade, porém baixa sensibilidade em decorrência do grande número de mutações conhecidas, (RIBEIRO et al., 2002; DALCIN e ABREU, 2008; FARREL et al., 2008; CASTELLANI et al., 2008).

No caso de nenhuma ou apenas uma mutação ser detectada através do kit comercial, pode recorrer-se a um estudo molecular completo do gene *CFTR*. Normalmente, o sequenciamento completo do gene permite a análise da região promotora e de todos os éxons e regiões intrônicas flanqueadoras. Adicionalmente, pode ser também realizada a pesquisa de rearranjos do gene *CFTR*, como grandes deleções, inserções ou duplicações, pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e QF-PCR (*Quantitative Fluorescent multiplex PCR*) (DE BOECK et al., 2005; DEQUEKER et al., 2009; CULLING e OGLE, 2010).

Além das técnicas anteriormente descritas, outras podem ser utilizadas na detecção das mutações presentes no gene *CFTR* como a análise de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP), a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), hibridização de oligonucleotídeos alelo-específicos (ASO), sistema de mutação refratária à amplificação (ARMS-PCR), eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC) e sistemas de PCR em tempo real usando sondas para hibridização (DEQUEKER et al., 2009).

Face o acima exposto e em conformidade com Culling e Ogle (2010), haja vista o amplo conjunto de técnicas utilizadas para identificar as variações nas sequências do gene *CFTR*, não existe um padrão-ouro para o teste de rotina.

Dentro deste cenário, a análise de mutações tem se mostrado muito útil para esclarecer casos de FC atípica, que podem apresentar resultados de teste do suor inconclusivo ou normais (ROSENSTEIN, 2003; FOLESCU e COHEN, 2011). Neste sentido, alguns estudos mostraram associação das mutações R117H, P5L, D1152H e polimorfismos com concentrações de cloro no suor normal ou *borderline* (NOOIJER et al., 2011; SPICUZZA et al., 2012; TERLIZZI et al., 2015). Além disso, é uma técnica que possibilita o diagnóstico molecular precoce nos pacientes fibrocísticos e possui valor prognóstico e epidemiológico, identificando portadores de alelos para FC e

permitindo a documentação de mutações raras no gene *CFTR* (LYON e MILLER, 2003).

Em alguns países, onde o diagnóstico molecular faz parte dos exames dos programas de triagem neonatal, esta estratégia diagnóstica tem se mostrado significativa para melhorar a qualidade de vida e, conseqüentemente, a sobrevida dos pacientes fibrocísticos (FOLESCU e COHEN, 2011). Nos EUA, por exemplo, o teste genético é menos oneroso do que o teste do suor e como a mutação mais frequente no país é a F508del, o teste molecular costuma ser a primeira opção de diagnóstico (BREDEMEIER, 2005). Além disso, em países desenvolvidos é comum a utilização de kits diagnósticos desenvolvidos a partir das mutações mais frequentes nos países de origem, como, por exemplo, o kit Elucigene (Tepnel Diagnostics Ltda.), que detecta simultaneamente até 50 mutações frequentes em diferentes países europeus (FRENTESCU et al., 2008).

Entretanto, no Brasil a análise de DNA é uma das alternativas menos escolhida para o diagnóstico da FC, dado seu alto custo, o grande número de mutações envolvidas e os poucos centros capacitados em realizá-la (BREDEMEIER, 2005; FOLESCU e COHEN, 2011). Ademais, a sensibilidade da genotipagem para FC depende inteiramente do número de mutações testadas e da etnia dos indivíduos testados (CABELLO et al., 2011; SARAIVA-PEREIRA et al., 2011). Geralmente a reduzida sensibilidade é em decorrência do número de mutações conhecidas e da miscigenação racial, uma vez que as mutações causadoras da FC em países desenvolvidos não são as mesmas encontradas no Brasil (CABELLO et al., 2003; FAUCZ et al., 2010).

Contudo, mesmo com a futura melhora da sensibilidade dos testes genéticos, uma grande parcela dos pacientes com FC será portador de uma mutação não identificada (REIS e DAMACENO, 1998). Em função disso é aconselhável que seja analisado o maior número de mutações disponíveis, levando-se em conta o perfil mutacional de cada população (CABELLO et al., 2003; FOLESCU e COHEN, 2011).

No Brasil, o programa nacional de triagem neonatal contempla o diagnóstico precoce para FC com a dosagem do IRT, o teste do suor e a pesquisa de uma única mutação genética, no caso, a F508del (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Neste sentido, é necessário um processo diagnóstico estruturado, com uma triagem molecular mais detalhada, incluindo mutações além da F508del, para validar ou excluir

o diagnóstico (KIEHL, 2010; CABELLO et al., 2011; SARAIVA-PEREIRA et al., 2011).



### 3 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

Atualmente o diagnóstico, manejo e tratamento de pacientes fibrocísticos são voltados para os avanços genéticos. Hoje em dia sabe-se que a utilização de estratégias baseadas na análise de diferentes mutações do gene *CFTR* e o conhecimento do perfil mutacional, variável em populações étnicas e geograficamente diferentes, permite i) aumentar a acuidade do diagnóstico, melhorando o valor preditivo dos programas de rastreio; ii) correlacionar o genótipo-fenótipo, possibilitando prever como evoluirá a doença, facilitando estratégias para o controle das manifestações clínicas futuras e iii) utilizar tratamentos específicos e mais efetivos em função da disfunção genética responsável pela doença, uma vez que já existem no mercado tratamentos específicos para certas mutações, além de outras terapias genéticas em fase de desenvolvimento.

Neste sentido, o conhecimento do perfil mutacional da população de Santa Catarina é crucial para o desenho e aplicação de qualquer nova estratégia em prol de avanços diagnósticos e terapêuticos para as crianças e jovens catarinenses afetados pela doença. Todavia, diante da ausência de estudos moleculares prévios, há total desconhecimento do perfil mutacional do gene *CFTR* no Estado, impossibilitando implementar ou melhorar quaisquer estratégias baseadas na relação genótipo-fenótipo.

Frente ao exposto, justifica-se a urgente necessidade de determinar a frequência das mutações do gene *CFTR* e conhecer o perfil genético de Santa Catarina. Além disso, o projeto se diferencia por sua relevante característica de inovação científica e seu desenvolvimento propiciará dados de extrema importância para o seguimento de diferentes linhas de pesquisa, uma voltada a desenvolver novas tecnologias para testes diagnósticos e a outra para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo ambulatorial e tratamento mais apropriadas.

Ademais, com o conhecimento do painel de mutações características da população de Santa Catarina, estratégias de diagnóstico e tratamento específicos poderão começar a ser aplicadas. Isto colocaria o Estado de Santa Catarina ao lado de países desenvolvidos, onde tais estratégias já estão bem determinadas e são rotineiramente utilizadas. É importante destacar que os resultados deste estudo terão consequências práticas, de aplicações clínicas imediatas, já que os dados a serem obtidos irão proporcionar à equipe multidisciplinar

de FC do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) informações essenciais para: i) adequar o acompanhamento multidisciplinar dos pacientes incluídos neste estudo, uma vez que através da informação genotípica e sua correlação com o fenótipo será possível antecipar estratégias voltadas a adiar e controlar as complicações decorrentes da doença; e ii) possibilitar aos clínicos optarem por terapias personalizadas, uma vez que já existe no mercado internacional tratamentos específico para certas mutações.

## 4 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- Determinar o perfil mutacional do gene *CFTR* na população de Santa Catarina;

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da frequência das mutações do gene *CFTR* identificadas no Estado de Santa Catarina;
- Padronizar e validar protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo *Allele Specific Oligonucleotide* (ASO) para a detecção individual das mutações: F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A;
- Identificar mutações conhecidas e/ou mutações raras e/ou novas mutações (não descritas) do gene *CFTR* por sequenciamento.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto intitulado "Desenvolvimento de um kit diagnóstico de Fibrose Cística" foi submetido ao Comitê de Ética do HIJG de Florianópolis e aprovado em 11 de setembro de 2014 (CONEP 789.932/2014), conforme parecer anexo 1.

### 5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trata-se de um estudo prospectivo com coleta de dados retrospectiva de 113 pacientes com achados clínicos de FC, atendidos no HIJG de Florianópolis no período de 2002 a 2016. Optou-se por realizar o estudo neste hospital por ser um Centro de Referência em FC, que recebe pacientes encaminhados de serviços públicos e particulares de todo o Estado de Santa Catarina.

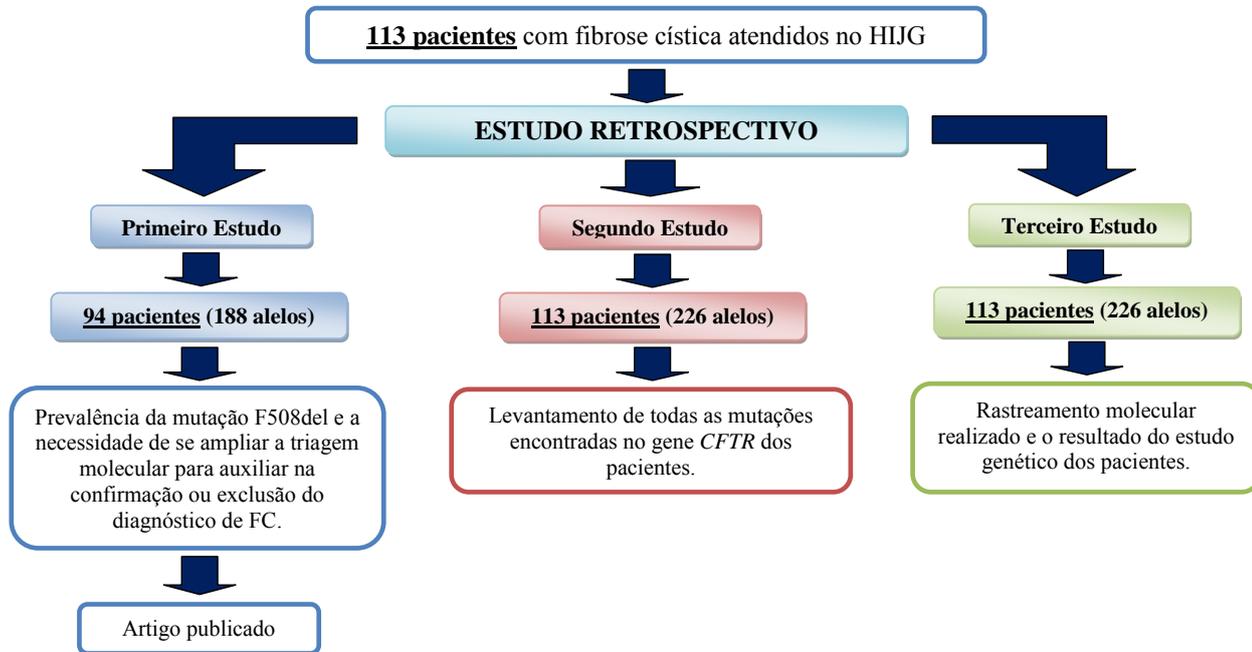
Em relação à coleta de dados retrospectiva, que compõe a primeira parte desta pesquisa (Fluxograma 2), foram realizados 3 estudos a partir da análise dos prontuários dos 113 pacientes. No primeiro estudo, realizado com 94 dos 113 pacientes avaliamos a prevalência da mutação F508del em Santa Catarina e a necessidade de se ampliar a triagem molecular para auxiliar na confirmação ou exclusão do diagnóstico de FC. Este primeiro estudo resultou em um artigo, que foi publicado em revista internacional (anexo 2). Em um segundo estudo foi realizado um levantamento de todas as mutações encontradas no gene *CFTR* dos 113 pacientes. No terceiro estudo avaliamos o rastreamento molecular realizado e o resultado do estudo genético dos pacientes.

Com base no segundo estudo retrospectivo foi realizado, inicialmente uma padronização e validação de protocolos de *singleplex* PCRs-ASO para a detecção individual das mutações de maior frequência alélica, utilizando-se de amostras controles positivas para as mutações selecionadas. Posteriormente, 27 pacientes aceitaram participar do estudo prospectivo, sendo que 21 foram submetidos à detecção molecular por PCR-ASO das mutações de maior frequência alélica encontradas no segundo estudo retrospectivo e 6 foram submetidos ao sequenciamento de Nova Geração para a investigação de

mutações raras e/ou novas mutações (não descritas) do gene *CFTR* (Fluxograma 3).

Inicialmente, os pacientes ou seus responsáveis legais foram esclarecidos quanto ao objetivo da pesquisa, forma de condução (sigilo e privacidade), os métodos aplicados e os benefícios que o projeto poderia trazer. Após os esclarecimentos foram convidados a participar da pesquisa, e, havendo interesse, foi solicitada a confirmação da participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

Após o consentimento por escrito dos responsáveis legais, uma alíquota de 2 mL de sangue periférico foi coletada em tubo a vácuo com EDTA. Estas amostras de sangue foram encaminhadas para o Laboratório DNAnálises em Florianópolis/SC, seguindo as normativas de transporte de amostras biológicas estipuladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para extração do DNA genômico e, posteriormente, realização da PCR-ASO. Para a realização do sequenciamento, amostras de DNA genômico foram encaminhadas em gelo seco para a Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS.



**Fluxograma 2.** Delineamento experimental do estudo retrospectivo.



**Fluxograma 3.** Delineamento experimental do estudo prospectivo.

### **5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Foram incluídos no estudo pacientes com achados clínicos de FC, com confirmação pelo teste do suor;
- A participação no estudo somente foi aceita posteriormente à assinatura do TCLE pelo responsável legal.

### **5.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO**

- Foram excluídos do estudo pacientes, cujos responsáveis legais não aceitaram participar ou assinar o TCLE.

### **5.5 CASUÍSTICA**

#### **5.5.1 População do Estudo Prospectivo**

O grupo de participantes foi composto por 27 pacientes acompanhados pela equipe multidisciplinar de FC do HIJG, que previamente foram submetidos à dosagem do IRT no LACEN/SC, e ao teste do suor pela equipe de FC do HIJG. Além disso, os pacientes apresentavam características clínicas da doença. Os pacientes que compuseram a população de estudo eram provenientes de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina e possuíam diferentes origens étnicas, entre eles descendentes de portugueses, alemães, italianos, e outras origens.

#### **5.5.2 Grupo Controle**

Dois grupos controles foram utilizados neste estudo. O primeiro grupo sem FC, constituído de 2 doadores de sangue saudáveis, forneceu uma grande quantidade de DNA sem as mutações F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A e, portanto, foram utilizados como controles negativos das reações. Também foram utilizados controles negativos, sem adição de DNA.

O segundo grupo controle foi composto de 10 pacientes com FC que apresentaram as mutações em questão (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) e, portanto, foram convidados a participar da pesquisa como controles positivos.

O DNA obtido dos doadores de sangue sadios e dos pacientes convidados nos permitiu fazer os testes necessários à padronização da PCR tipo ASO e serviu de controle para todo o estudo.

## **5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS**

### **5.6.1 Extração do DNA**

O isolamento do DNA das amostras de sangue venoso foi realizado utilizando o Kit de extração por coluna (Ludwig Biotec®) e seguindo instruções do fabricante. Cerca de 200µL de sangue com anticoagulante EDTA foram adicionados a microtubos de 1,5mL contendo 20µL de proteinase K 20mg/mL (Ludwig Biotec), para a eliminação inicial de proteínas. Em seguida, foram adicionados 200µL de tampão CB (tampão do kit Ludwig Biotec®) para promover a lise das hemácias e lavagem da amostra, agitados por 30 segundos em vórtex e incubados por 10 minutos em termobloco a 70°C. Após a incubação foram acrescentados 100µL de isopropanol, seguido de 30 segundos de agitação em vórtex. Em seguida as amostras foram transferidas para a coluna acoplada ao microtubo de 2 mL e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o filtrado e acrescentou-se 500µL do tampão IR (tampão do kit Ludwig Biotec®) no interior da coluna para lavagem da amostra e eliminação de proteínas. Em seguida foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 30 segundos. O filtrado foi descartado e adicionou-se 600µL de tampão WB (tampão do kit Ludwig Biotec®) no interior da coluna, para a eliminação completa de impurezas da amostra. A seguir, foi realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 30 segundos e o filtrado novamente desprezado. Esta etapa com a adição do tampão WB foi repetida mais uma vez. Em seguida realizou-se a centrifugação com a coluna vazia para remover completamente o etanol da coluna, a 12.000 rpm por 2 minutos. Esta coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 50 µL do tampão de eluição (do kit Ludwig Biotec®) foram adicionados no centro da coluna. A seguir o microtubo e a coluna contendo o tampão de eluição foram incubados à temperatura

ambiente por 3 minutos e centrifugados à 12.000 rpm por 1 minuto para retirar o restante de DNA da coluna. Finalmente, a coluna foi descartada e o DNA obtido em 50 $\mu$ L de tampão de eluição (do kit Ludwig Biotec®), mantido a -20°C até o momento da análise.

### 5.6.2 Quantificação e grau de pureza do DNA

Após a extração de DNA, foi realizada a determinação da concentração e da pureza da amostra.

Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotômetro (NanoDrop® 1000 – Thermo Fisher Scientific, EUA). Este equipamento quantifica o DNA de cadeia dupla de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times \epsilon}{b}$$

Onde **C** é a concentração de DNA em ng/ $\mu$ L, **Abs** a absorvância (neste caso a 260nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA),  $\epsilon$  o coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50 ng.cm/ $\mu$ L) e **b** a altura da coluna criada no espectrofotômetro (que neste caso corresponde a 1cm). Assim, quando o NanoDrop® mede a absorvância a 260 nm obtêm-se um valor, que multiplicado por 50 (constante  $\epsilon$ ) indica a concentração de DNA na amostra, em ng/ $\mu$ L.

Além de calcular a concentração de DNA na amostra, este equipamento é acompanhado de um *software* que permite observar o espectro de absorvância da amostra em forma de gráfico permitindo que contaminações sejam detectadas mais facilmente (BOESENBERG-SMITH et al., 2012).

É importante medir a absorvância a 230nm e a 280nm uma vez que é comum as amostras de ácidos nucleicos estarem contaminadas com outras moléculas. Assim, ácidos nucléicos apresentam uma absorvância máxima a um comprimento de onda de 260nm, enquanto que as proteínas absorvem luz a 280nm e outros contaminantes orgânicos a 230nm. Com base nestas leituras, é calculada a razão da absorvância 260/280, que indica a pureza das amostras de DNA. O DNA puro deve apresentar uma razão A260/A280 que se situa entre 1,7 e 2,0 (AGRAWAL et al., 2011).

### 5.6.3 Eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA

Na avaliação da integridade do DNA foi preparado um gel de agarose a 1% (p/v) (Ludwig Biotec®) em tampão TBE 1X (Ludwig Biotec®) e adicionados 2,5 µL de brometo de etídio (Ludwig Biotec®), para atingir uma concentração de 0,5 µg/mL no gel. Foram aplicados 3 µL de azul de bromofenol (Ludwig Biotec®), com 5 µL de DNA em cada poço. Foi então aplicada uma corrente de 100 volts durante 20 minutos e após este tempo, o gel foi exposto à luz ultravioleta para detectar as bandas de DNA.

O DNA das amostras íntegro surgiu como uma banda bem definida enquanto que o aparecimento de arrastamento indicou degradação do material genético (VINOD, 2004).

### 5.6.4 Padronização da PCR-ASO para identificação das mutações F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A

A PCR-ASO é um método de detecção direta de mutações que utiliza um par de oligonucleotídeos com sequência específica na extremidade 3' para cada alelo presente no locus gênico (EDELMANN et al., 2004), requerendo, desta forma, duas amplificações independentes. Portanto, com duas PCRs diferentes é possível determinar se o paciente é homozigoto mutante, heterozigoto ou homozigoto selvagem, isto é, quando não possui a mutação.

Para a detecção da mutação F508del foi utilizado o protocolo descrito por Perone e colaboradores (2010), o qual foi testado e adaptado às condições de trabalho a fim de obter-se a máxima sensibilidade e especificidade com os reagentes e equipamentos disponíveis. Para tanto, foram utilizados os *primers* da tabela 2.

**Tabela 2.** Descrição da sequência dos iniciadores utilizados na PCR-ASO para a mutação F508del.

<i>Mutação</i>	<i>Sequência 5'→3'</i>	<i>Tamanho do produto (pb)</i>
F508del-S	ACC ATT AAA GAA AAT ATC	262
F508del-M	ATC TT	
F508del-R	ACC ATT AAA GAA AAT ATC	
	ATT GG	
	TGC AAG CTT CTT AAA GCA TA	

Sufixo –S indica um primer específico para alelo selvagem; sufixo –M um primer específico para alelo mutante e sufixo –R primer utilizado na amplificação tanto do alelo selvagem quanto mutante.

As condições de amplificação para a detecção da mutação F508del estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3.** Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação F508del, em um volume final de reação de 25 µL.

<b>Reagente</b>	<b>Concentração na reação</b>
DNA	50 ng
Tris-HCl pH 8,3 (100 mM)*	10 mM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)*	3 mM
dNTP (2,5 mM)*	0,2 mM
Iniciadores (100 pmoles-cada)*	10 pmoles
Taq polimerase (5U/µL)*	1,25 U

\*Ludwig Biotec®

O programa de termociclagem para a amplificação e detecção da mutação F508del está descrito na tabela 4.

**Tabela 4.** Programa de PCR-ASO para a realização do gradiente de temperatura no termociclador DA-7600 (Da An Gene Co.).

Ciclos da PCR-ASO	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	94°C	5 min	
Desnaturação	95°C	1 min	35 ciclos
Anelamento	54°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Extensão Final	72°C	10 min	

Para analisar o produto amplificado foi preparado um gel de agarose 2% (p/v) (Ludwig Biotec®) em tampão TBE 1X (Ludwig Biotec®) e adicionados 3,5 µL de brometo de etídio (Ludwig Biotec®), para atingir uma concentração de 0,7 µg/mL no gel. Dez microlitros do produto amplificado foram aplicados com 3 µL de azul de bromofenol (Ludwig Biotec®) em cada poço e a eletroforese decorreu durante 60 minutos a uma voltagem constante de 100 volts, utilizando um marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec®) (Anexo 4). Após este tempo, as bandas foram visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta (UV Transilluminator 2000 – Bio-Rad, EUA).

Para a realização da amplificação e detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A por PCR-ASO, foram desenhados *primers* específicos para as mutações alvo. As sequências dos iniciadores não serão apresentadas neste estudo (Tabela 5) por serem parte integrante de um kit diagnóstico para fibrose cística, o qual se encontra em fase de registro de patente. Entretanto, para esta etapa foram levadas em consideração as seguintes características dos iniciadores:

- Tamanho entre 18–28 nucleótidos, o que confere uma boa especificidade a uma única sequência alvo, mesmo com um molde complexo como o DNA genômico humano;
- Conteúdo ideal em GC de 40-60%, o que confere uma temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) mais elevada, aumentando a especificidade para o DNA molde;

- Ambos os iniciadores devem ter  $T_m$  que diferem entre si apenas de 2 a 5° C, assegurando que é atingida a temperatura de emparelhamento apropriada para os dois iniciadores no passo de anelamento.
- Devem ser evitadas sequências que sejam complementares no próprio iniciador, para evitar a formação de estruturas secundárias e também no outro iniciador, para evitar a formação de dímeros que podem competir com a amplificação do produto de PCR pretendido (KAMPKE et al., 2001).

**Tabela 5.** Tamanho do produto dos iniciadores utilizados na PCR-ASO para as mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A.

<i>Mutação</i>	<i>Tamanho do produto (pb)</i>
G542X	800
R334W	296
R1162X	453
N1303K	872
3120+1G>A	374

Para a detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A optou-se por utilizar a enzima Taq DNA Polimerase hot start, empregando para a Master mix seu tampão e cofator, resultando na produção de bandas mais intensas e específicas. As condições das *singleplex* PCRs padronizadas estão descritas nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 6.** Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação G542X, R334W, R1162X e N1303K, em um volume final de reação de 25  $\mu$ L.

Reagente	Concentração na reação
DNA	50 ng
Tampão de PCR (5X)**	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)**	0,75 mM
dNTP (2,5 mM)*	0,2 mM
Iniciadores (10 $\mu$ M-cada)***	0,4 $\mu$ M
Taq polimerase Hot Start (5U/ $\mu$ L)**	1,25 U

\*Ludwig Biotec®; \*\*Promega®; \*\*\*Sigma®.

**Tabela 7.** Preparação da mix de PCR-ASO para amplificação e detecção da mutação 3120+1G>A, em um volume final de reação de 25  $\mu$ L.

Reagente	Concentração na reação
DNA	50 ng
Tampão de PCR (5X)**	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)**	0,75 mM
dNTP (2,5 mM)*	0,2 mM
Iniciadores (10 $\mu$ M-cada)***	0,6 $\mu$ M
Taq polimerase Hot Start (5U/ $\mu$ L)**	1,25 U

\*Ludwig Biotec®; \*\*Promega®; \*\*\*Sigma®.

O parâmetro fundamental que determina o sucesso da reação de PCR é a temperatura à qual os iniciadores se ligam à sequência-alvo, ou seja, a temperatura de anelamento. Esta temperatura situa-se geralmente 5°C abaixo da T<sub>m</sub> dos iniciadores. Assim, uma das formas de otimização do PCR é realizar um gradiente que compreenda um intervalo que inclua estas temperaturas, a fim de determinar a mais específica (ISHII e FUKUI, 2001). Nesta pesquisa, a temperatura específica de anelamento dos *primers* dirigidos às mutações G542X,

R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A foi de 60°C, conforme observado na tabela 8.

**Tabela 8.** Programa de PCR-ASO para a realização do gradiente de temperatura no termociclador DA-7600 (Da An Gene Co.).

Ciclos da PCR-ASO	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	94°C	2 min	
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	60°C	1 min	35 ciclos
Extensão	72°C	1 min	
Extensão Final	72°C	5 min	

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 2% (p/v) (Ludwig Biotec®) com tampão TBE 1X (Ludwig Biotec®) e adicionados 3,5 µL de brometo de etídio (Ludwig Biotec®), para atingir uma concentração de 0,7 µg/mL no gel. Dez microlitros do produto amplificado foram aplicados com 3 µL de azul de bromofenol (Ludwig Biotec®) em cada poço e a eletroforese decorreu durante 60 minutos a uma voltagem constante de 100 volts, utilizando um marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec®) (Anexo 4). Após este tempo, as bandas foram visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta (UV Transilluminator 2000 – Bio-Rad, EUA).

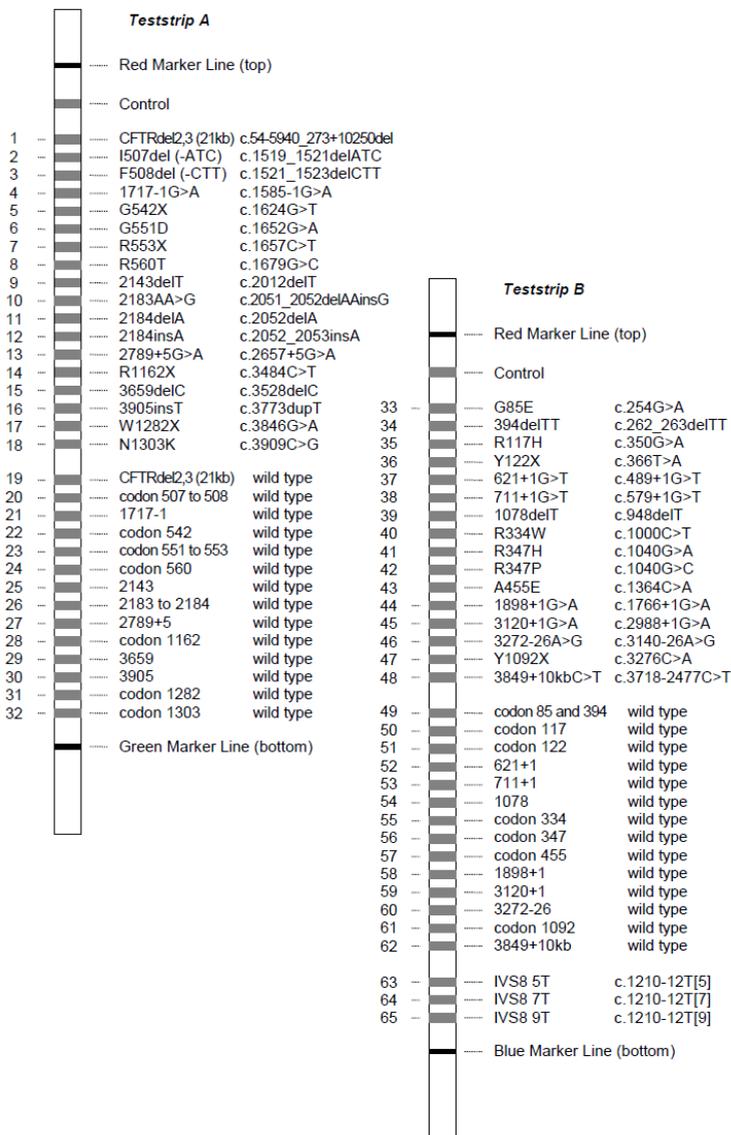
### 5.6.5 Validação da técnica de PCR-ASO e comparação dos resultados obtidos com os do HIJG

O controle de qualidade dos resultados foi realizado por meio da reprodutibilidade intra e inter-ensaio. Para os testes intra-ensaio houve repetição de todas as amplificações e comparação com os resultados anteriormente obtidos.

Em relação aos testes de reprodutibilidade inter-ensaio foi realizada uma comparação dos resultados da PCR-ASO do presente estudo com os resultados obtidos de um kit diagnóstico para fibrose cística de 34 mutações (CFTRdel 2,3 (21kb), I507del (-ATC), F508del (-CTT), 1717-1G>A, G542X, G551D, R553X, R560T, 2143delT,

2183AA>G, 2184delA, 2184insA, 2789+5G>A, R1162X, 3659delC, 3905insT, W1282X, N1303K; G85E, 394delTT, R117H, Y122X, 621+1G>T, 711+1G>T, 1078delT, R334W, R347H, R347P, A455E, 1898+1G>A, 3120+1G>A, 3272-26A>G, Y1092X, 3849+10kbC>T, IVS8 5T/7T/9T) (Figura 5). Este kit inclui três passos: (1) isolamento do DNA; (2) amplificação por PCR utilizando *primers* biotinizados e (3) hibridação dos produtos de amplificação em uma tira teste, na qual se encontram sondas de oligonucleotídeos alelo-específicas dispostas em um *array* de linhas paralelas. As sequências biotinizadas ligadas neste *array* são detectadas usando fosfatase alcalina-estreptavidina e substratos de cor (CF StripAssay®).

Para finalizar, quando possível foi comparado os resultados da técnica de PCR-ASO com os resultados obtidos do HIJG.



**Figura 5.** Desenho dos TestStrips.

Fonte: Adaptado do manual de uso do kit CF StripAssay® (Vienna Lab).

### 5.6.6 Sequenciamento de Nova Geração

Para investigar a ocorrência de polimorfismos/mutações raras e/ou novas mutações (não descritas) no gene *CFTR* foi realizado o sequenciamento de amostras de DNA genômico de 6 pacientes (Fluxograma 4) através do uso de tecnologia baseada em chip semicondutor sensível ao íon hidrogênio ( $H^+$ ) (Ion Torrent *Personal Genome Machine*/Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA). Este consiste num método de sequenciamento de DNA por síntese, baseado na detecção de íons  $H^+$  que são liberados durante a polimerização de DNA, desta forma, o sistema Ion Torrent é capaz de determinar a sequência da molécula em estudo, transformando o sinal químico em sinal digital (MERRIMAN et al., 2012).

As etapas envolvidas no processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent foram as seguintes: 1) Construção da biblioteca; 2) Preparo de *template* e 3) Sequenciamento em chip semicondutor (SHENDURE e JI, 2008; MERRIMAN et al., 2012; MARDIS, 2013).

A construção da biblioteca iniciou-se com a amplificação dos 27 éxons do gene *CFTR* por PCR *multiplex*. Em seguida, os *amplicons* produzidos nesta reação receberam nas extremidades 3' e 5' dois adaptadores de DNA com sequência conhecida, os quais são essenciais nas etapas posteriores do processo. Nesta etapa foram utilizados o kit Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA) e painel de *primers* específico (Ion AmpliSeq™ *CFTR* Panel (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA)) para amplificação do gene *CFTR*. Como foram processadas 6 amostras na mesma corrida de sequenciamento, junto aos adaptadores sequências denominadas de *barcodes* foram utilizadas. Estas sequências são específicas para cada amostra, permitindo que no momento da análise cada amostra seja devidamente separada (MARDIS, 2008; MERRIMAN et al., 2012).

As bibliotecas de DNA resultantes foram purificadas utilizando-se microesferas magnéticas (*beads* (AMPure beads)). Após o preparo das bibliotecas de DNA, realizou-se a etapa de PCR em emulsão utilizando-se as esferas conhecidas como *Ion Sphere Particles* – ISP, que contém *primers* complementares aqueles adaptadores adicionados durante o preparo da biblioteca. Nesta etapa, ocorre o preparo dos moldes para sequenciamento (*template*) através de uma PCR em emulsão, a qual consiste na amplificação clonal dos fragmentos de DNA dentro de

micelas geradas em uma solução emulsionada. Cada fragmento de DNA é isolado em uma micela independente, a qual funciona como um microrreator. Os microrreatores gerados na reação, quando submetidos a ciclos de PCR, fazem com que os adaptadores da biblioteca hibridizem ao *primer* da microesfera, produzindo novas cadeias de DNA fita dupla ligadas às *beads*. Após o término da reação, a emulsão foi desfeita com uma solução de recuperação contendo detergente. As microesferas carregadas (positivas) foram recuperadas e separadas daquelas onde não houve amplificação através da reação de enriquecimento, a qual se baseia na interação estreptavidina-biotina. Portanto, na etapa final do enriquecimento, as esferas positivas recuperadas estavam com DNA fita simples ligado a elas (METZKER, 2010).

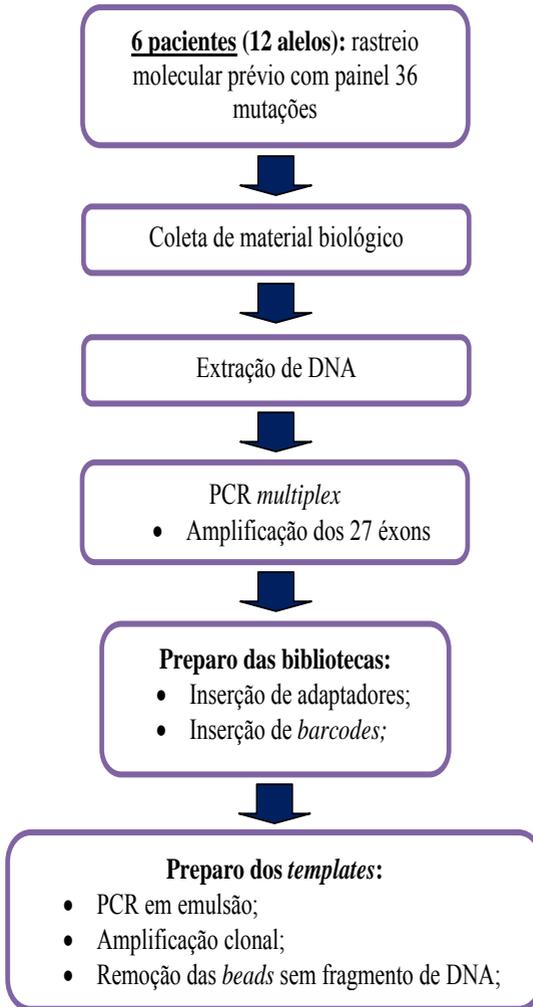
Finalmente, as microesferas positivas contendo DNA foram depositadas em um chip semicondutor para sequenciamento. O chip semicondutor utilizado na reação foi o Ion 314<sup>TM</sup> Chip v2 com rendimento de até 100 Mb. Este chip é constituído por milhares de poços de diâmetro micrométrico, cada um com diâmetro suficiente para acomodar apenas uma microesfera carregada (MERRIMAN et al., 2012).

Abaixo dos micropoços, existe uma placa-sensor ISFET (*Ion-Sensitive field-effect transistor*) que é sensível a alterações de pH. O equipamento Ion Torrent *Personal Genome Machine* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA) fornece às microesferas carregadas quatro nucleotídeos (A, C, T ou G) separadamente, desta forma, quando ocorre a incorporação de algum nucleotídeo em algum fragmento de DNA, a ligação fosfodiéster gerada liberará íons  $H^+$  no meio, alterando o pH no micropoço de reação. Esta alteração de pH foi detectada pelos semicondutores e transformada em impulsos elétricos que são interpretados por algoritmos especializados (ROTHBERG et al., 2011; MERRIMAN et al., 2012).

A análise da informação bruta obtida no sequenciamento foi realizada utilizando-se a plataforma de bioinformática *Ion Reporter* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, EUA), o programa VEP (*Variant Effect Predictor*) do *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) e o software de análise de seqüências de DNA *Enlis Genome Research*.

As alterações detectadas (polimorfismos e mutações) foram identificadas recorrendo às bases de dados *Cystic Fibrosis Mutation Database* (CFTR1) (<http://www.genet.sickkids.on.ca/app>), *Clinical and*

*Functional Translation of CFTR* (CFTR2) (<https://www.cftr2.org/>) e ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).



**Fluxograma 4.** Etapas envolvidas no processo de sequenciamento.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESTUDO RETROSPECTIVO

Após levantamento e análise dos prontuários dos 113 pacientes incluídos neste estudo foram identificadas 14 mutações, responsáveis por 69% dos alelos de FC em Santa Catarina, sendo que 70 alelos (30,97%) não foram identificados a partir do rastreio prévio utilizado (mutação F508del e painéis 3 e 36 mutações). A análise dos 226 alelos demonstrou que das 14 mutações identificadas, 6 (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) apresentavam frequência alélica superior a 1%, totalizando em conjunto 65,04% dos alelos caracterizados (Anexo 5). As demais mutações detectadas mostraram frequências menores que 1% e foram responsáveis por 3,08% dos alelos de FC.

A descrição da frequência alélica para as mutações identificadas é apresentada na tabela 9.

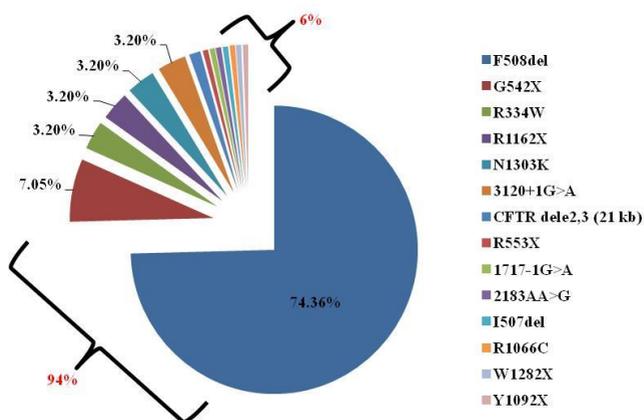
**Tabela 9.** Descrição da frequência alélica das mutações identificadas nos pacientes com fibrose cística atendidos no HIJG.

<i>Alelos</i>	<i>n</i>	<i>Frequência (%)</i>
F508del	116	51,33
G542X	11	4,87
R334W	5	2,21
R1162X	5	2,21
N1303K	5	2,21
3120+1G>A	5	2,21
CFTR dele2,3 (21 kb)	2	0,88
R553X	1	0,44
1717-1G>A	1	0,44
2183AA>G	1	0,44
I507del	1	0,44
R1066C	1	0,44

W1282X	1	0,44
Y1092X	1	0,44
Não identificado	70	30,97
<b>Total</b>	<b>226</b>	<b>100</b>

*n*: número de alelos;

Excluindo-se os alelos que não puderam ser identificados (30,97% dos casos), as 6 mutações com maior frequência representam 94% dos alelos identificados a partir do rastreamento prévio utilizado (mutação F508del e painéis 3 e 36 mutações) (Figura 6).



**Figura 6.** Distribuição das 6 mutações de maior frequência sobre o total de alelos de FC identificados no Estado de Santa Catarina.

Quinze genótipos foram definidos a partir do rastreamento prévio, conforme observado na tabela 10. Entre estes, a mutação F508del em homocigose foi a mais frequente, observada em 35 (30,97%) pacientes. Cinquenta e quatro pacientes (47,79%) não tiveram o diagnóstico molecular definido, apesar de todos apresentarem os critérios clínicos característicos da doença (Anexo 5). Destes ( $n=54$ ), 40 (74,07%) apresentaram o genótipo parcialmente caracterizado e nenhuma mutação foi detectada nos outros 14 (25,92%).

**Tabela 10.** Descrição da frequência genotípica das mutações identificadas nos pacientes com fibrose cística atendidos no HIJG.

<i>Genótipos</i>	<i>n</i>	<i>Frequência (%)</i>
F508del/ F508del	35	30,97
F508del/N1303K	5	4,42
F508del/R1162X	3	2,65
F508del/R334W	2	1,77
G542X/R334W	2	1,77
G542X/3120+1G>A	2	1,77
G542X/G542X	2	1,77
F508del/3120+1G-A	1	0,88
R1162X/R1162X	1	0,88
G542X/R553X	1	0,88
G542X/1717-1G>A	1	0,88
F508del/2183AA>G	1	0,88
F508del/W1282X	1	0,88
F508del/Y1092X	1	0,88
3120+1G>A/I507del	1	0,88
F508del/?	33	29,20
G542X/?	2	1,77
CFTR dele2,3 (21 Kb)/?	2	1,77
R334W/?	1	0,88
3120+1G>A/ ?	1	0,88
R1066C/?	1	0,88
?/?	14	12,39
<b>Total</b>	113	100

*n*: tamanho amostral em número absoluto de pacientes; ? = Mutação não identificada;

As 6 mutações selecionadas para realizar o estudo prospectivo, quando em combinação, apresentaram potencial para definir o

diagnóstico molecular em 89,83% dos pacientes – 9 dos 15 genótipos definidos.

## 6.2 ESTUDO PROSPECTIVO

### 6.2.1 Determinação da concentração, grau de pureza e integridade do DNA genômico

As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram avaliadas segundo o procedimento de controle de qualidade anteriormente citado, que engloba a determinação da concentração de DNA, grau de pureza e avaliação da integridade do material genético.

Em relação aos parâmetros de concentração e grau de pureza, as amostras encontravam-se dentro do intervalo aceitável com uma concentração média de DNA de  $58,5 \pm 32,1$  e razão da absorbância 260/280 média de  $1,79 \pm 0,05$  (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resultados da quantificação e grau de pureza das amostras de DNA avaliadas pelo equipamento NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific).

<i>Amostra</i>	<i>Concentração de DNA (ng/μL)</i>	<i>Razão A260/A280</i>
25	89,8	1,79
26	80,5	1,78
27	44,0	1,72
29	78,0	1,77
31	165,2	1,84
1	34,6	1,75
8	59,5	1,81
11	13,8	1,70
16	84,0	1,83
18	37,3	1,84
20	55,7	1,76
21	46,7	1,73

<b>6</b>	50,4	1,75
<b>9</b>	55,8	1,85
<b>17</b>	35,8	1,77
<b>19</b>	98,6	1,78
<b>24</b>	53,6	1,78
<b>30</b>	35,1	1,86
<b>33</b>	71,9	1,79
<b>34</b>	89,9	1,83
<b>36</b>	24,9	1,70
<b>37</b>	40,6	1,79
<b>38</b>	43,1	1,74
<b>39</b>	14,9	1,90

As amostras com parâmetros fora do controle de qualidade apresentavam concentração média de DNA de  $33,5 \pm 24,0$  e razão A260/A280 média de  $1,64 \pm 0,02$  (Tabela 12).

**Tabela 12.** Resultados da quantificação e grau de pureza das amostras que se encontravam fora do intervalo da razão A260/A280.

<i>Amostra</i>	<i>Concentração de DNA (ng/<math>\mu</math>L)</i>	<i>Razão A260/A280</i>
<b>28</b>	27,2	1,67
<b>35</b>	65,5	1,63
<b>10</b>	7,7	1,61

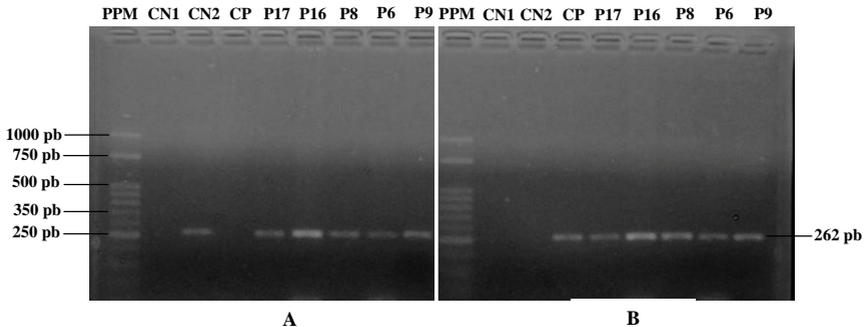
Após a verificação destes parâmetros, as amostras foram avaliadas quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), onde foram observadas bandas sem a presença de arrastamento, indicando que as mesmas não se encontravam degradadas.

Após o controle de qualidade das 27 amostras foi possível determinar que, relativamente à pureza do DNA, 88,9% das amostras encontravam-se dentro do intervalo 1,7 e 2,0 e 11,1% não foram aceitas neste parâmetro, no entanto, esta limitação da amostra não comprometeu as análises posteriores. Em relação à integridade do DNA em gel de

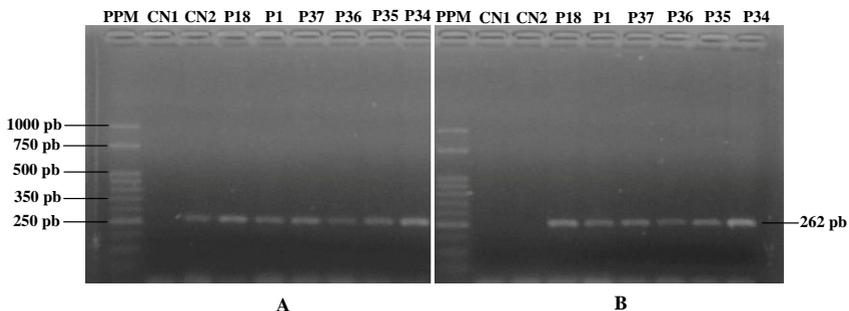
agarose, 81,5% das amostras apresentavam DNA genômico íntegro com bandas bem definidas enquanto 18,5% não apresentavam bandas definidas.

### 6.2.2 Padronização da técnica de PCR-ASO para detecção da mutação F508del

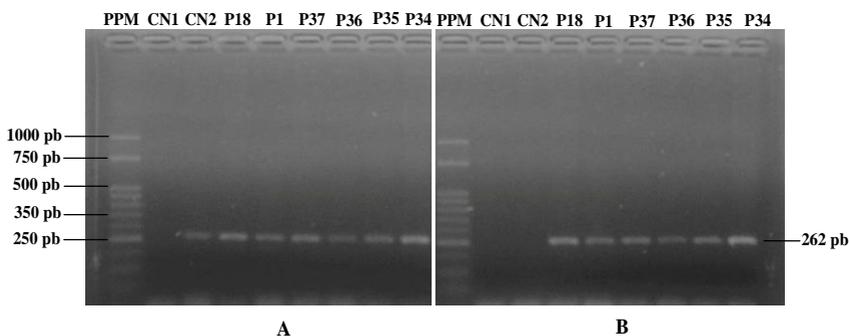
Neste estudo, os resultados da PCR-ASO para detecção da mutação F508del apresentavam concordância absoluta com os resultados do HIJG, conforme pode ser observado nas figuras 7 a 11. E os testes intra-ensaio revelaram reprodutibilidade de 100%, pois não houve discrepância entre os resultados obtidos na primeira e na segunda amplificação.



**Figura 7.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** Padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo (paciente não portador da deleção F508del); **CP:** controle positivo (paciente portador da deleção F508del em homozigose (F508del/F508del)); **P17:** paciente 17 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P16:** paciente 16 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P8:** paciente 8 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P6:** paciente 6 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P9:** paciente 9 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?);



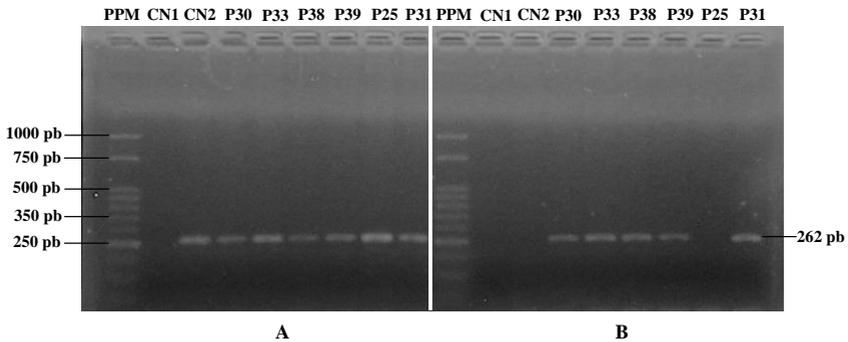
**Figura 8.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo (paciente não portador da deleção F508del); **P18:** paciente 18 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P1:** paciente 1 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P37:** paciente 37 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P36:** paciente 36 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P35:** paciente 35 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P34:** paciente 34 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?);



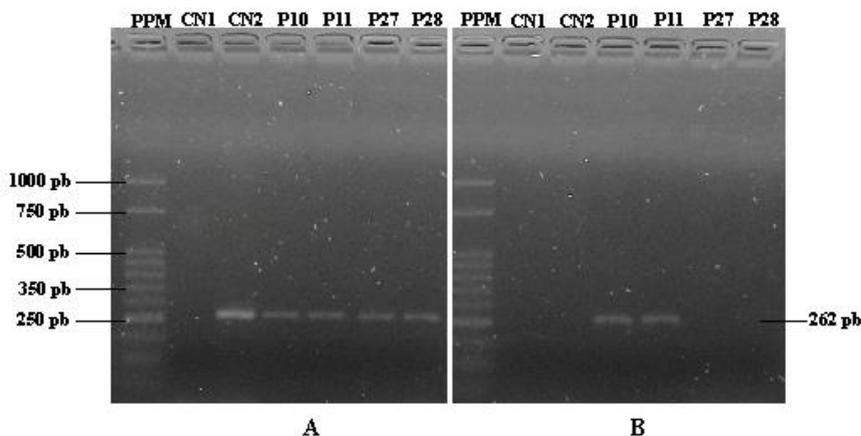
**Figura 9.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a

amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante.

**PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo (paciente não portador da deleção F508del); **P19:** paciente 19 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P29:** paciente 29 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P26:** paciente 26 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P24:** paciente 24 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P21:** paciente 21 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P20:** paciente 20 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?);



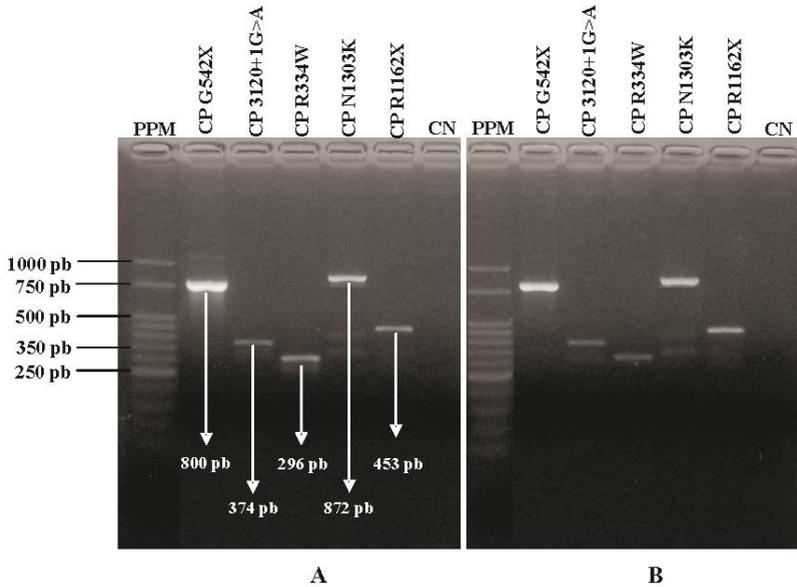
**Figura 10.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo (paciente não portador da deleção F508del); **P30:** paciente 30 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P33:** paciente 33 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P38:** paciente 38 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P39:** paciente 39 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P25:** paciente 25 - não portador da deleção F508del; **P31:** paciente 31 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?);



**Figura 11.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação F508del em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo (paciente não portador da deleção F508del); **P10:** paciente 10 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P11:** paciente 11 - heterozigoto para a deleção F508del (F508del/?); **P27:** paciente 27 - não portador da deleção F508del; **P28:** paciente 28 - não portador da deleção F508del;

### 6.2.3 Padronização da técnica de PCR-ASO para detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A

A padronização realizada neste estudo foi bem sucedida, pois apresentou reprodutibilidade intra-ensaio de 100% e concordância absoluta com os resultados do HIJG, conforme demonstrado na figura 12.

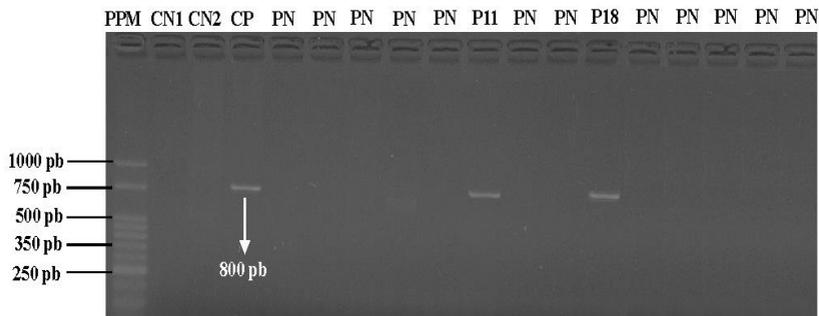


**Figura 12.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação das mutações G542X, 3120+1G>A, R334W, N1303K e R1162X em gel de agarose 2% (p/v). Em **A** está representada a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo selvagem ou normal e em **B** a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM**: padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CP G542X**: controle positivo - heterozigoto para a mutação G542X (G542X/?); **CP 3120+1G>A**: controle positivo - heterozigoto para a mutação 3120+1G>A (3120+1G>A/?); **CP R334W**: controle positivo - heterozigoto para a mutação R334W (?); **CP N1303K**: controle positivo - heterozigoto para a mutação N1303K (?); **CP R1162X**: controle positivo - heterozigoto para a mutação R1162X (?); **CN**: controle negativo sem adição de DNA;

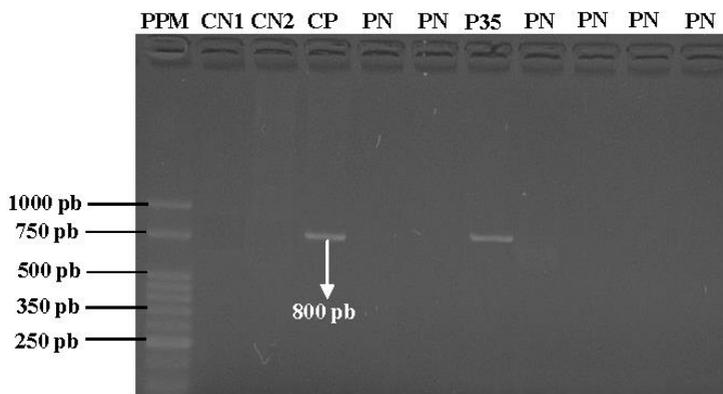
#### 6.2.4 Detecção das mutações G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A

Uma única amplificação com iniciadores dirigidos ao alelo mutante foi realizada, pois os pacientes deste estudo eram heterozigotos para a mutação F508del, logo se determinou a mutação do outro alelo.

Nenhum dos pacientes do estudo apresentou a mutação 3120+1G>A, entretanto, os pacientes que apresentavam as mutações G542X, R334W, N1303K e R1162X estão demonstrados nas figuras 13 a 20. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, acrescidos de um controle negativo (sem adição de DNA), controle negativo (pacientes sem a mutação) e controle positivo (pacientes com a mutação em questão).

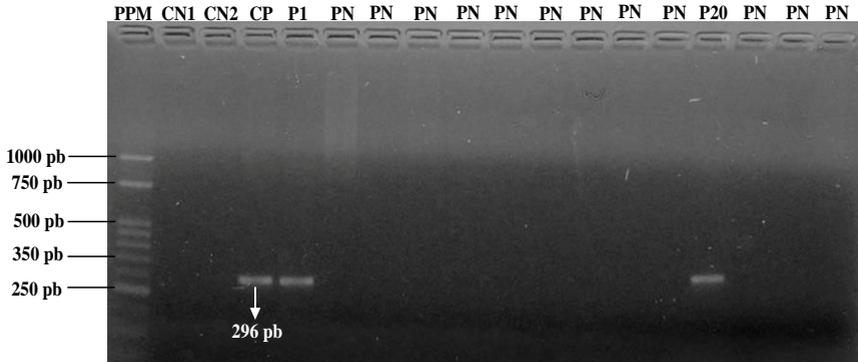


**Figura 13.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação G542X em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo para a mutação G542X; **CP:** controle positivo para a mutação G542X; **PN:** pacientes negativos para a mutação G542X; **P11:** paciente 11 - positivo para a mutação G542X; **P18:** paciente 18 - positivo para a mutação G542X;

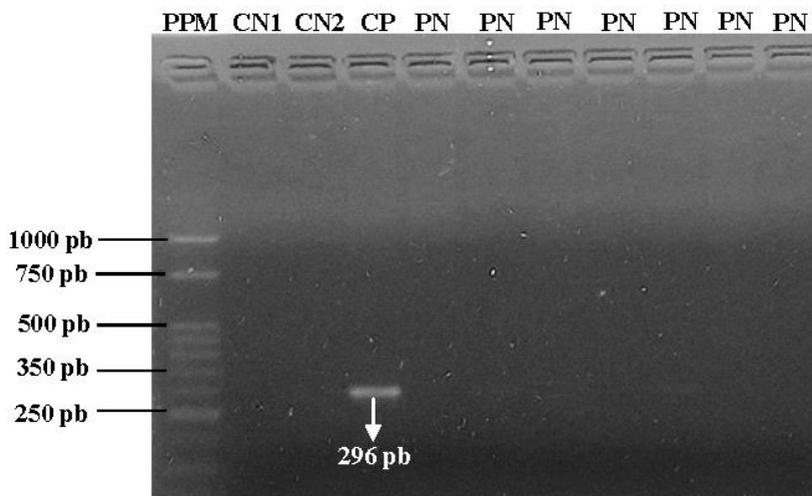


**Figura 14.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação G542X em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a

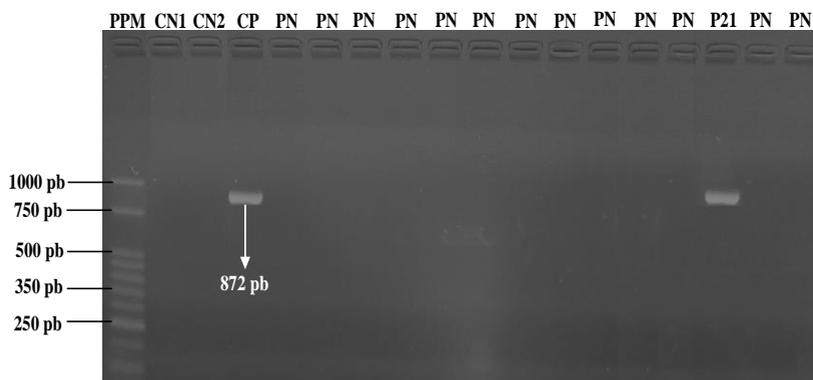
amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM**: padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1**: controle negativo sem adição de DNA; **CN2**: controle negativo para a mutação G542X; **CP**: controle positivo para a mutação G542X; **PN**: pacientes negativos para a mutação G542X; **P35**: paciente 35 - positivo para a mutação G542X;



**Figura 15.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R334W em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM**: padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1**: controle negativo sem adição de DNA; **CN2**: controle negativo para a mutação R334W; **CP**: controle positivo para a mutação R334W; **P1**: paciente 1 - positivo para a mutação R334W; **PN**: pacientes negativos para a mutação R334W; **P20**: paciente 20 - positivo para a mutação R334W;

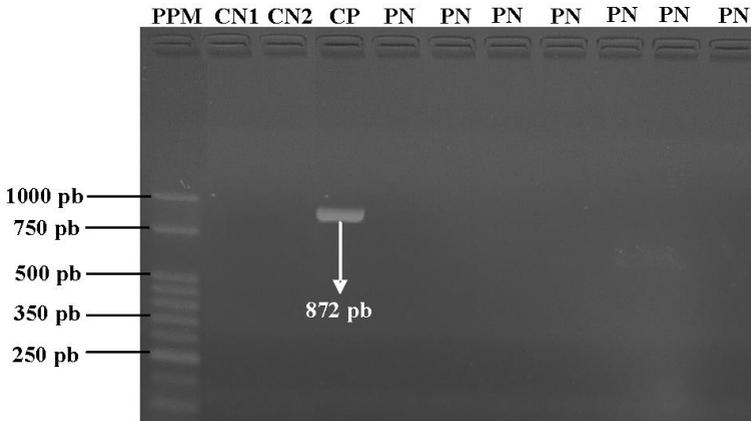


**Figura 16.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R334W em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo para a mutação R334W; **CP:** controle positivo para a mutação R334W; **PN:** pacientes negativos para a mutação R334W;

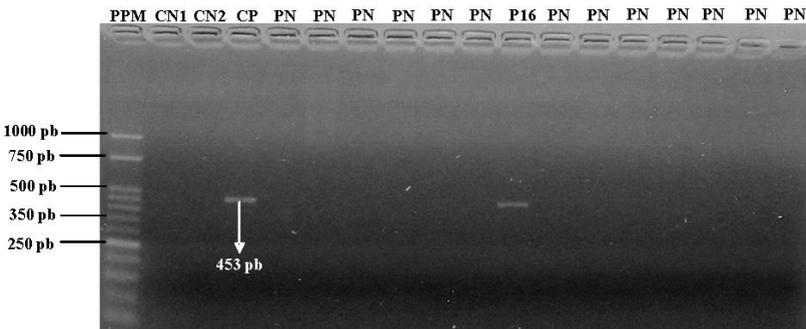


**Figura 17.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação N1303K em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a

amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1:** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo para a mutação N1303K; **CP:** controle positivo para a mutação N1303K; **PN:** pacientes negativos para a mutação N1303K; **P21:** paciente 21 - positivo para a mutação N1303K;

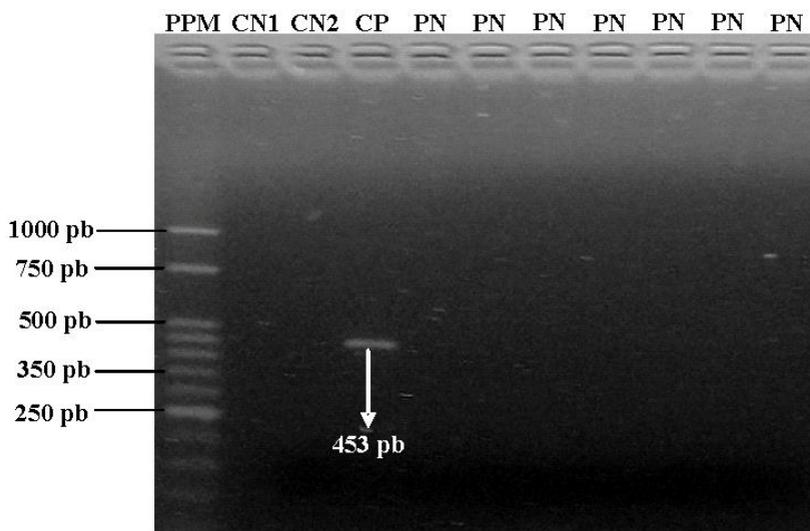


**Figura 18.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação N1303K em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM:** padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1** controle negativo sem adição de DNA; **CN2:** controle negativo para a mutação N1303K; **CP:** controle positivo para a mutação N1303K; **PN:** pacientes negativos para a mutação N1303K;



**Figura 19.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R1162X em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a

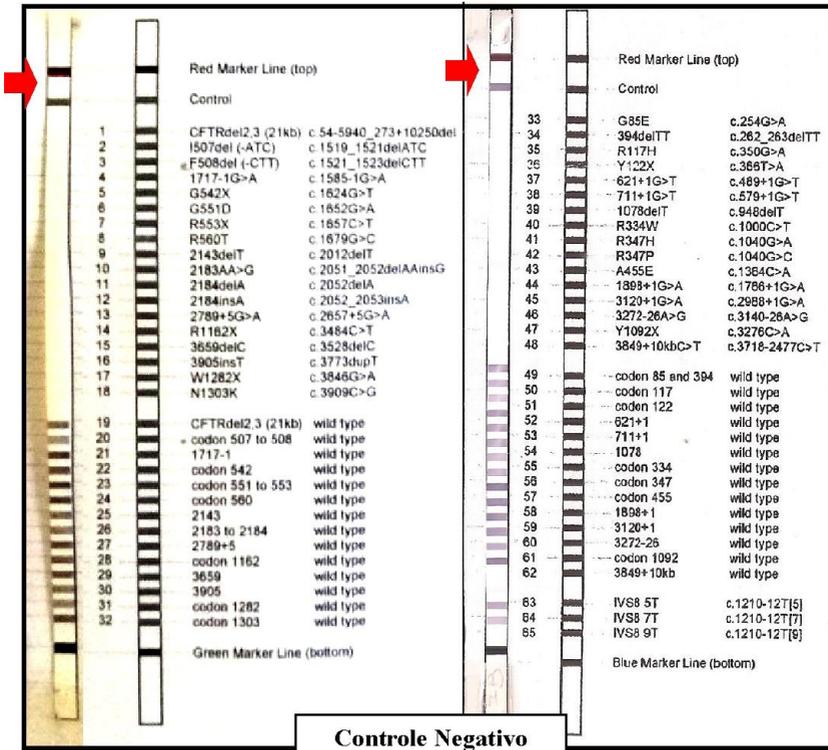
amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM**: padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1**: controle negativo sem adição de DNA; **CN2**: controle negativo para a mutação R1162X; **CP**: controle positivo para a mutação R1162X; **PN**: pacientes negativos para a mutação R1162X; **P16**: paciente 16 - positivo para a mutação R1162X;



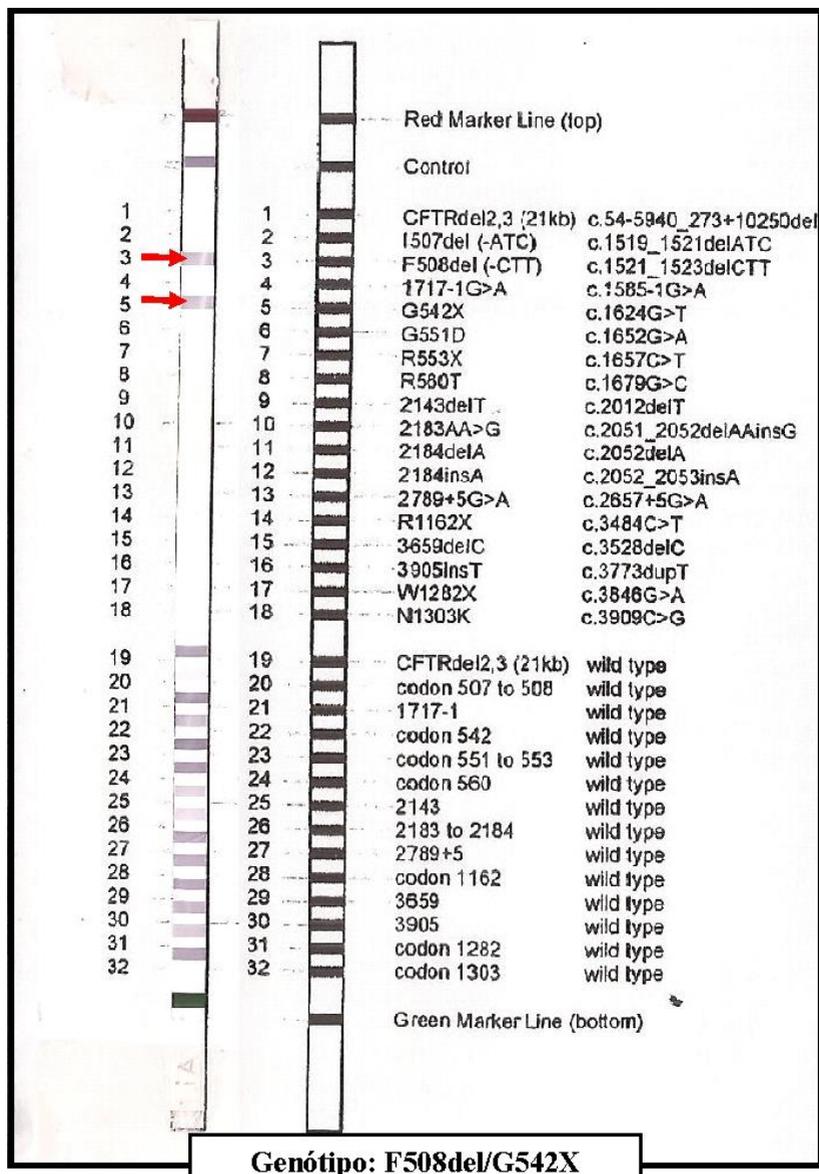
**Figura 20.** Eletroforese dos produtos resultantes da amplificação da mutação R1162X em gel de agarose 2% (p/v). Representada somente a amplificação com os iniciadores dirigidos ao alelo mutante. **PPM**: padrão de peso molecular com 50pb (Ludwig Biotec®); **CN1**: controle negativo sem adição de DNA; **CN2**: controle negativo para a mutação R1162X; **CP**: controle positivo para a mutação R1162X; **PN**: pacientes negativos para a mutação R1162X;

## 6.2.5 Reprodutibilidade inter-ensaio dos resultados

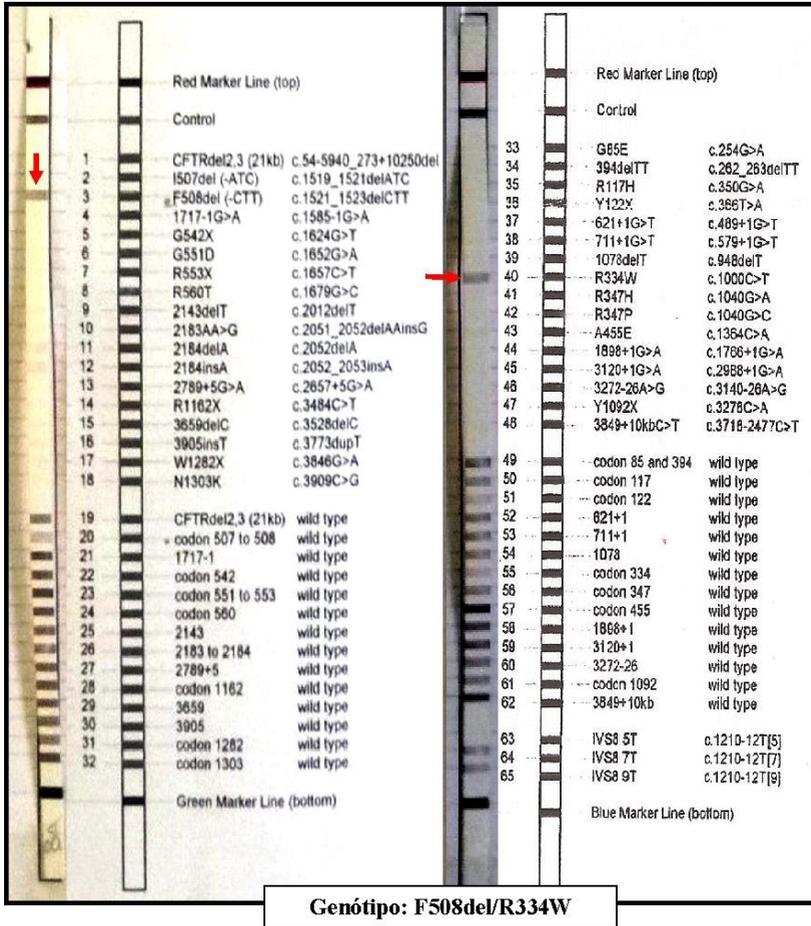
Os resultados obtidos na PCR-ASO para as mutações F508del, G542X R334W, N1303K, R1162X e 3120+1G>A foram comparados aos resultados obtidos em um Kit de diagnóstico de fibrose cística, constituído a partir de um painel de 34 mutações (Figuras 21 a 26). Estes testes inter-ensaio para uma mesma amostra de DNA revelaram concordância de 100% e comprovaram a especificidade, reprodutibilidade e acurácia da técnica de PCR-ASO padronizada neste estudo.



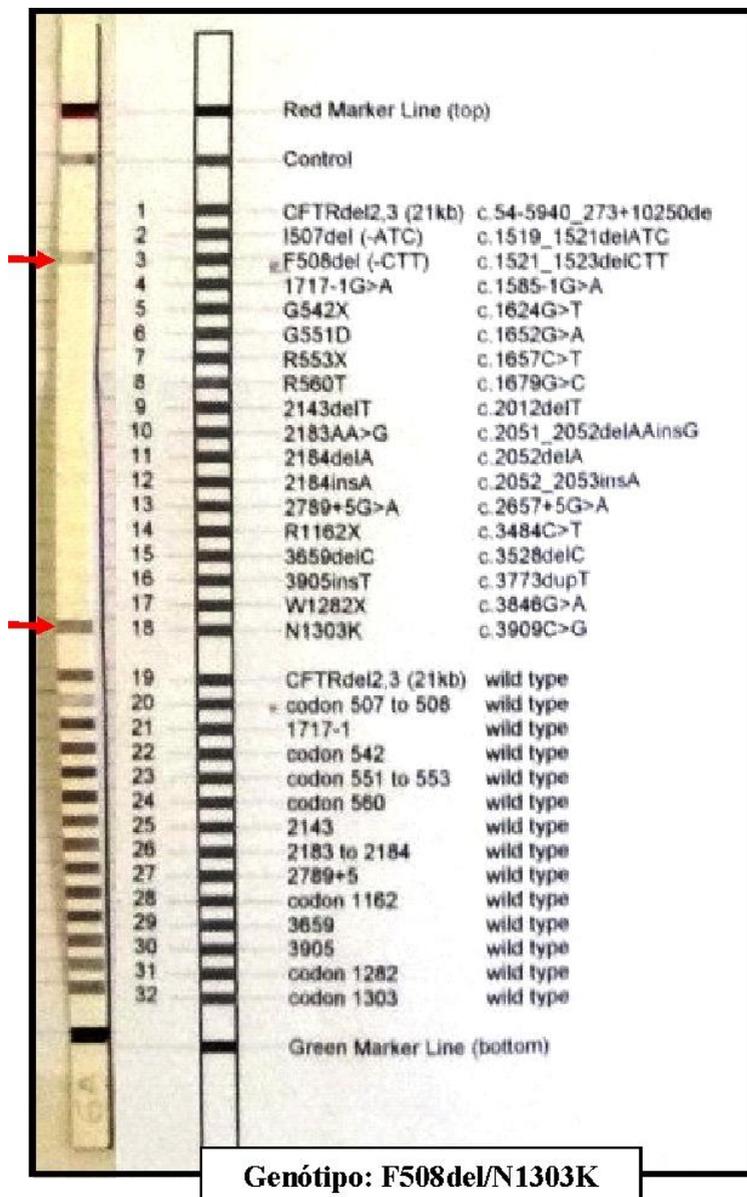
**Figura 21.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para o controle negativo (paciente sem as mutações F508del, G542X, R334W, N1303K, R1162X e 3120+1G>A). A seta indica o controle da prova.



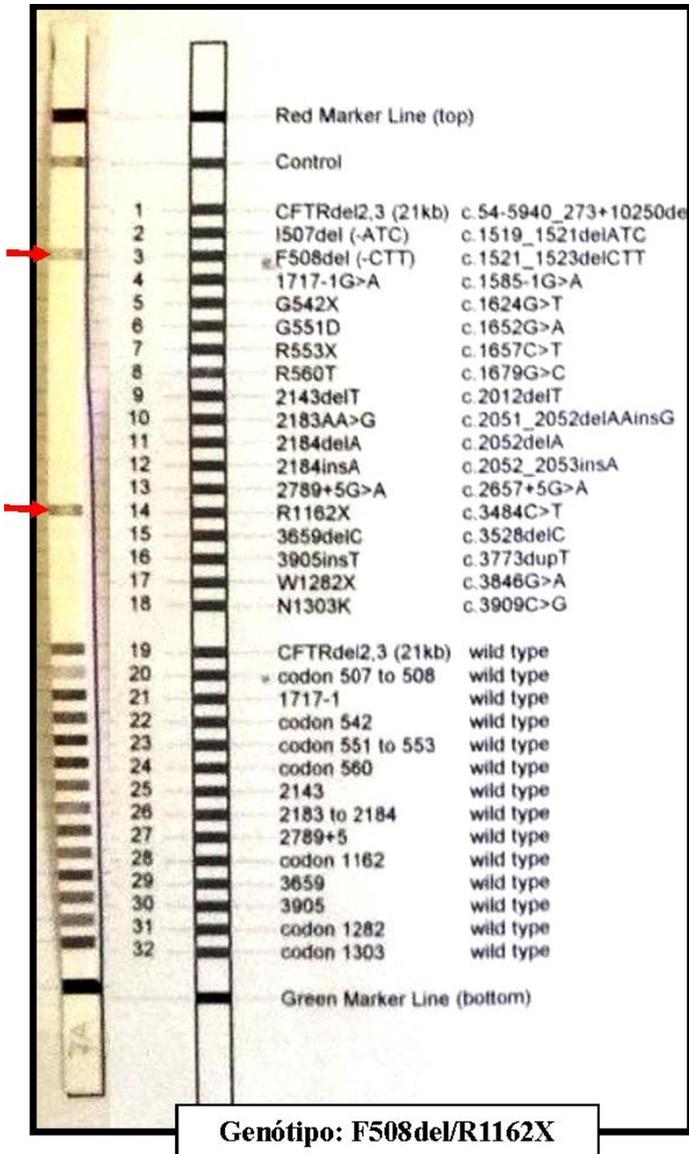
**Figura 22.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 11, 18 e 35, heterozigotos compostos para as mutações F508del/G542X.



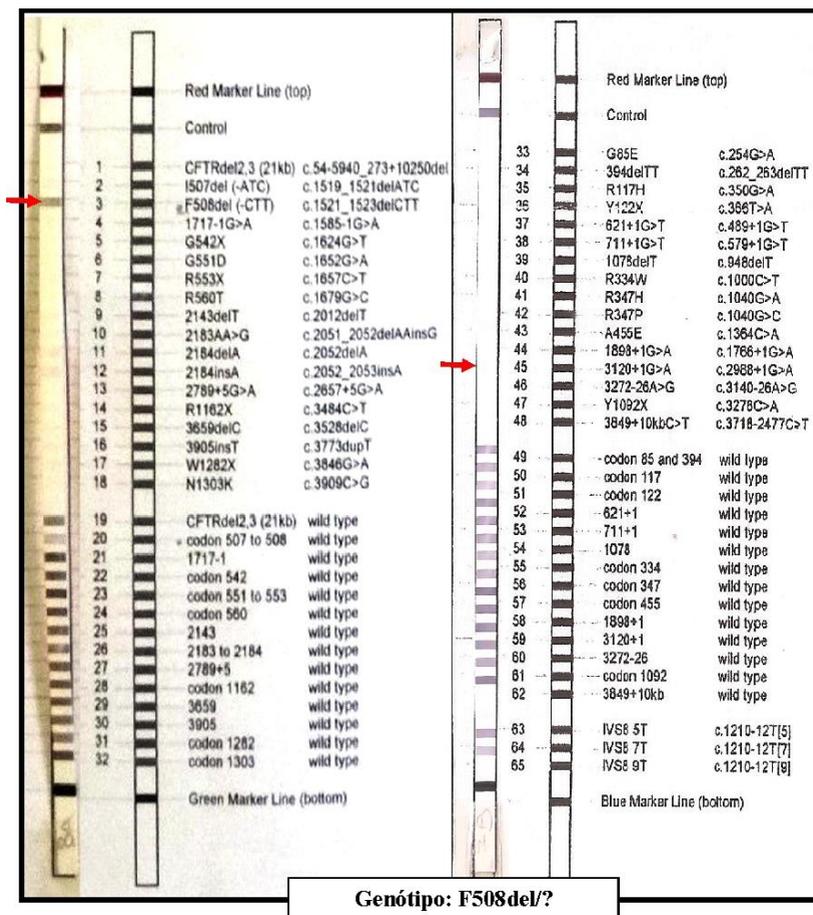
**Figura 23.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 1 e 20, heterozigotos compostos para as mutações F508del/R334W.



**Figura 24.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para o paciente 21, heterozigoto composto para as mutações F508del/N1303K.



**Figura 25.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para o paciente 16, heterozigoto composto para as mutações F508del/R1162X.



**Figura 26.** Resultado obtido com o painel 34 mutações para os pacientes 6, 17 e 34, negativos para a mutação 3120+1G>A e heterozigotos para a mutação F508del.

### **6.2.6 Panorama do rastreamento com as mutações F508del, G542X R334W, N1303K, R1162X e 3120+1G>A**

No terceiro estudo retrospectivo, onde avaliamos o rastreamento molecular realizado e o resultado do estudo genético dos pacientes, observamos que 54 dos 113 pacientes atendidos no HIJG apresentavam genótipo parcialmente definido ou não identificado (Anexo 5). Com base neste estudo foi possível definir a população de estudo, entretanto, somente 27 dos 54 pacientes aceitaram coletar a amostra de sangue e participar do estudo prospectivo.

Estes 27 pacientes previamente realizaram rastreio molecular para a mutação F508del ou painel 3 mutações (F508del; R553X; N1303K) ou painel 36 mutações (711+1G>T; 3120+1G>A; 621+1G>T; 1717-1G>A; CFTR dele2,3(21Kb); 3849+10Kb C>T; 2789+5G>A; 1898+1G>A; G542X; G85E; Y1092X(C>A); G551D; R553X; 3659delC; N1303K; R560T; R117H; R1162X; L1077P; R117C; R1066C; L1065P; W1282X; R347H;R347P; I507del; T338I; F508del; I336K; 1677delTA; R334W; 3272-26 A>G; 1078delT; 2183AA>G; 2184insA; 2143delT e região poliT), conforme observado na tabela 13. Os pacientes (n=21) que realizaram rastreamento molecular prévio para a mutação F508del ou painel de 3 mutações foram submetidos à detecção molecular por PCR-ASO das 6 mutações de maior frequência alélica (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) encontradas no segundo estudo retrospectivo (Anexos 5 e 6).

Neste estudo preliminar com 21 pacientes (42 alelos), o rastreamento molecular com as mutações de maior frequência alélica definiu o genótipo em 7 (33,33%) e apresentou um poder de detecção de 66,67% (Tabelas 14 e 15). Quatorze pacientes (66,66%) não tiveram o genótipo definido pelo rastreio molecular com as 6 mutações e nenhum paciente do estudo apresentou a mutação 3120+1G>A.

**Tabela 13.** Participantes da pesquisa, rastreamento molecular previamente realizado e resultado do teste genético.

<b>Pacientes</b>	<b>Rastreamento molecular realizado*</b>	<b>Resultado do teste genético*</b>
<b>1</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>6</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>8</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>9</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>10</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>11</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>16</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>17</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>18</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>21</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>30</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>33</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>34</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>35</b>	F508del	F508del em heterozigose
<b>19</b>	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
<b>20</b>	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose

24	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
36	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
37	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
38	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
39	Painel 3 mutações	F508del em heterozigose
25	Painel 36 mutações	Negativo
26	Painel 36 mutações	F508del em heterozigose
27	Painel 36 mutações	Negativo
28	Painel 36 mutações	R1066C em heterozigose
29	Painel 36 mutações	F508del em heterozigose
31	Painel 36 mutações	F508del em heterozigose

\*Informações obtidas de prontuários e laudos de investigação genética do HIJG.

**Tabela 14.** Genótipos definidos com 5 mutações.

<i>Genótipos</i>	<i>n</i>	<i>Frequência (%)</i>
F508del/G542X	3	14.28
F508del/R334W	2	9.52
F508del/R1162X	1	4.76
F508del/N1303K	1	4.76
<b>Total</b>	7	33,33

*n*: tamanho amostral em número absoluto de pacientes.

**Tabela 15.** Frequência alélica das 5 mutações nos pacientes analisados.

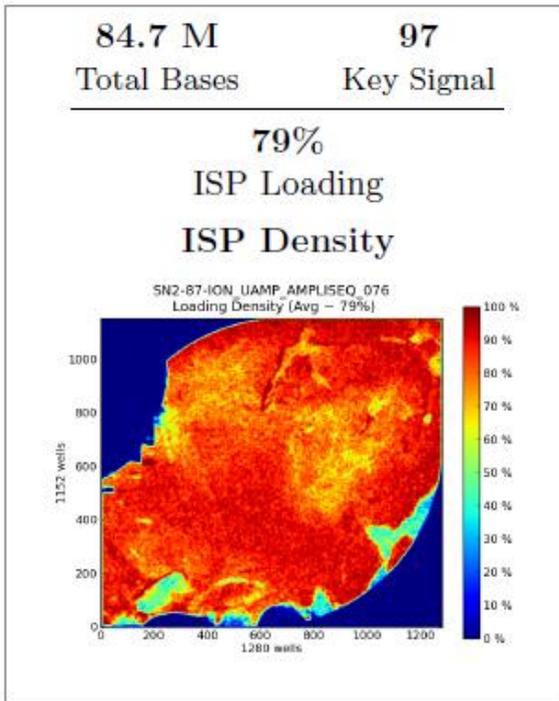
<i>Mutações detectadas</i>	<i>n</i>	<i>Frequência (%)</i>
F508del	21	50
G542X	3	7.14
R334W	2	4.76
R1162X	1	2.38
N1303K	1	2.38
<b>Poder de detecção</b>	28	66,67
ND	14	33,33
<b>Total</b>	42	100

*n*: número de alelos; ND: alelos com mutações não detectadas;

## 6.2.7 Sequenciamento de Nova Geração

### 6.2.7.1 Controle de qualidade e desempenho

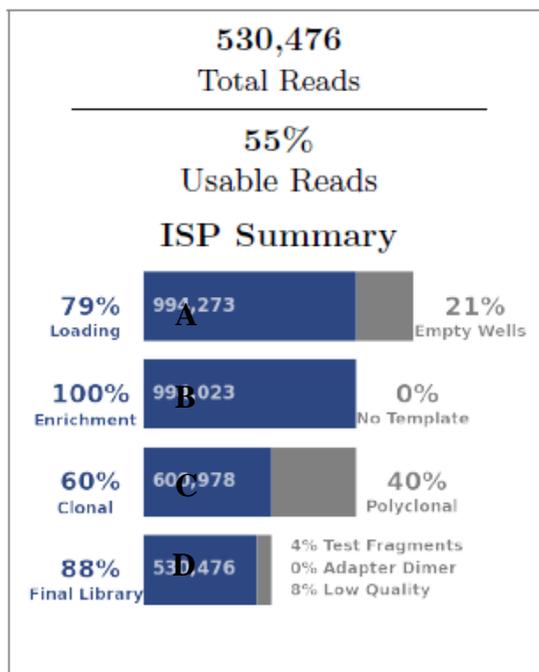
O sequenciamento do gene *CFTR* dos 6 pacientes, que previamente realizaram triagem com painel de 36 mutações (Tabela 13 e Anexo 6), foi processado na mesma corrida produzindo um *pool* de amostras, o que gerou um perfil de resultados em termos de rendimento e qualidade dos dados. Os dados obtidos do experimento apresentaram boa qualidade. Esta ocorrência deveu-se em parte às condições de carregamento do chip com as microesferas contendo em sua superfície as moléculas a serem sequenciadas. O carregamento do chip com as microesferas enriquecidas foi eficiente, pois o total de bases geradas a partir do carregamento de 79% da área total do chip foi de 84,7 Mb (Figura 27).



**Figura 27.** Imagem da área de carregamento do chip contendo as microesferas (*Ion Sphere Particles*- ISP) com os *pools* de amplicons. A variação da escala de cores indica a densidade de poços carregados com *beads* enriquecidas; cores tendendo para o vermelho indicam boa densidade, e cores tendendo para o azul, indicam baixa densidade de microesferas carregadas. M: Megabases

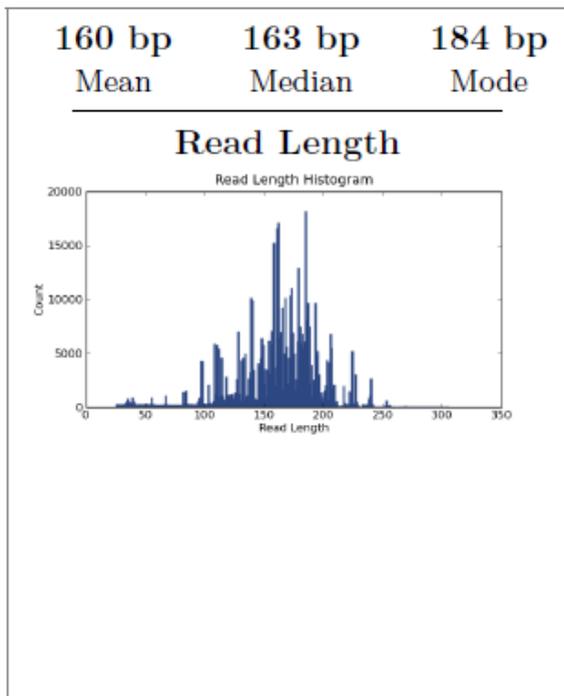
A figura 28 apresenta um resumo das condições de carregamento do chip. O total de microesferas carregadas foi de 994.273, que ocuparam uma área de 79% do chip (Figura 28A). Destas, 100% continham moléculas de DNA (Figura 28B) e destas, 60% (600.978 microesferas) eram clonais (Figura 28C), ou seja, microesferas com apenas um tipo de molécula de DNA que foi sequenciada em um poço específico. Das 600.978 microesferas clonais, 88% (530.476) geraram leituras de *reads* que foram utilizadas nas análises; os 12% excluídos correspondem a 8% retirados por serem de baixa qualidade e 4%

continham sequências de teste de fragmento, sequências conhecidas e introduzidas junto com a biblioteca para análise de qualidade (Figura 28D). Do total de bases geradas (84,7 Mb) 55% geraram sequências adequadas.



**Figura 28.** Rendimento das microesferas (*Ion Sphere Particles*- ISP) geradas. **A)** carregamento do chip, **B)** presença de microesferas enriquecidas, **C)** presença de microesferas clonais, **D)** biblioteca efetiva.

A figura 29 apresenta o perfil de distribuição do tamanho das *reads* e seu número total por tamanho. Observa-se um perfil de distribuição das *reads* na faixa entre 160 e 184 pb. Este perfil reflete uma seleção uniforme na etapa final do preparo da biblioteca, pois o perfil esperado é de um pico único na faixa entre 170 e 220 pb para um melhor rendimento e montagem inequívoca dos alinhamentos.



**Figura 29.** Distribuição dos tamanhos das leituras geradas. O eixo  $y$  corresponde ao número de reads e o eixo  $x$ , o tamanho das *reads*.

A tabela 16 apresenta os resultados de qualidade geral das *reads* e bases alinhadas. O parâmetro AQ (*Alignment Quality*) refere-se à qualidade de alinhamento em escala *Phred*; AQ17 corresponde à escala *Phred* de 17, ou seja, 2% de erro na identificação de bases em uma determinada *read* (isto é, 2 nucleotídeos incorretos em uma *read* de 100 pb); AQ20 equivale a 1% de erro e "perfeito" equivale a qualidade igual ou superior a AQ30 ( $\leq 0,1\%$  de erro). O resultado de alinhamento das *reads* para o *pool* de pacientes apresentou 67,8 Mb de seqüências com qualidade superior a AQ30; estas seqüências correspondem a *reads* com comprimento médio de 139 pb sem nenhum erro de sequenciamento.

**Tabela 16.** Qualidade de alinhamento das *reads*.

	<i>AQ17</i>	<i>AQ20</i>	<i>Perfeito</i>
<b>Número total de bases (Mb)</b>	79,95	77,1	67,8
<b>Comprimento médio (pb)</b>	158	154	139

*AQ17*: alignment quality 17; *AQ20*: alignment quality 20; Mb: mega bases; pb: pares de bases.

Para concluir, o sequenciamento do gene *CFTR* nos 6 pacientes gerou uma média de 86.300 *reads* por paciente. Em média, 98% destas são mapeadas para as regiões alvo do gene *CFTR*. Para os 6 pacientes analisados em um chip 314<sup>TM</sup> obteve-se uma cobertura média de 225.000X, que se mostrou muito satisfatória, uma vez que os valores de cobertura impactam diretamente na qualidade e confiabilidade da detecção de variantes.

### 6.2.7.2 Alterações encontradas

No total, foram detectadas 9 alterações diferentes nas 6 amostras, descritas na tabela 17.

**Tabela 17.** Alterações detectadas nas 6 amostras analisadas por sequenciamento.

Nome legal	Localização	cDNA	dbSNP
<b>E92X*</b>	Éxon 4	c.274G>T	rs121908751
<b>M470V**</b>	Éxon 10	c.1408G>A	rs213950
<b>P205S*</b>	Éxon 6	c.613C>T	rs121908803
<b>F508del*</b>	Éxon 10	c.1521_1523delCTT	rs113993960
<b>IVS8(TG)m**</b>	Íntron 8	c.1242-12_1242-35TG	rs200454589
<b>R1066C*</b>	Éxon 20	c.3196C>T	rs78194216
<b>406-6T-&gt;C**</b>	Íntron 3	c.274-6T>C	rs371315549
<b>711+5G-&gt;A*</b>	Íntron 5	c.579+5G>A	rs78440224
<b>3132delTG*</b>	Éxon 19	c.3002_3003delTG	rs193922731

\*Mutações; \*\*Polimorfismos; dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database*;

Dos 6 pacientes, que previamente realizaram o rastreamento molecular com painel 36 mutações, 3 tiveram o genótipo (mutação) definido pelo sequenciamento, 2 tiveram o genótipo parcialmente definido e 1 não teve o genótipo definido por nenhuma das duas técnicas (Tabela 18).

**Tabela 18.** Comparação dos resultados obtidos com o painel 36 mutações e sequenciamento dos 6 pacientes incluídos no estudo.

<b>PACIENTES</b>	<b>RESULTADOS PAINEL 36 MUTAÇÕES</b>		<b>RESULTADOS SEQUENCIAMENTO</b>	
	<b>Genótipo Mutações</b>	<b>Genótipo Polimorfismos</b>	<b>Genótipo Mutações</b>	<b>Genótipo Polimorfismos</b>
<b>25</b>	ND	ND	E92X/?	M470V/?
<b>26</b>	F508del/?	9T/7T	F508del/ P205S	M470V/?
				9T/7T
<b>27</b>	ND	7T/7T	ND	M470V/?
				7T/7T
<b>28</b>	R1066C/?	7T/7T	R1066C/?	406-6T->C/?
				7T/7T
<b>29</b>	F508del/?	9T/7T	F508del/ 711+5G- >A	M470V/?
				9T/7T
<b>31</b>	F508del/?	9T/7T	F508del/ 3132delTG	M470V/?
				9T/7T

ND: Nenhuma mutação detectada pela técnica; ? = Mutação ou polimorfismo não detectado;

## 7 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 7.1 ESTUDO RETROSPECTIVO

No Brasil, o programa nacional de triagem neonatal contempla a triagem para FC com a dosagem sérica do IRT. A confirmação diagnóstica com a análise da concentração de eletrólitos no suor (teste do suor) e a pesquisa da mutação mais comum, a F508del (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Entretanto, estudos mostraram que a frequência da mutação F508del no Brasil é de aproximadamente 47% (FAUCZ et al., 2010), muito similar as frequências encontradas em Portugal (45%), Espanha (53%) e Itália (51%), provavelmente em decorrência da colonização ocorrida no Brasil por esses países (BOBADILLA et al., 2002). Deste modo, não sendo a população brasileira etnicamente homogênea, a heterogeneidade de mutações varia entre as regiões (ALVAREZ et al., 2004; OKAY et al., 2005).

No presente estudo, dos 226 alelos analisados (Tabela 9), a mutação F508del foi identificada em 116 (51,33%). Outras pesquisas de frequência alélica realizadas no Brasil também revelaram variações na prevalência da F508del como observado por Streit et al. (2003) no Rio Grande do Sul, Raskin et al. (2003) no Paraná, Coutinho et al. (2013) em São Paulo, Perone et al. (2010) em Minas Gerais, Cabello et al. (2001) no Rio de Janeiro e Araújo et al. (2005) no Pará, nos quais, respectivamente, as análises de 154, 100, 140, 222, 148 e 66 alelos, mostraram a frequência de 48,7%, 39%, 50%, 48,2%, 25,68% e 22,7%. Além da mutação F508del apresentar prevalências variáveis de Estado para Estado, a sua frequência também tem se mostrado reduzida em comparação as taxas mundiais e aquelas registradas em populações euro-descendentes (cerca de 66% dos casos), provavelmente em decorrência da variação étnica em cada região (BOBADILLA et al., 2002; ALVAREZ et al., 2004; OKAY et al., 2005).

Embora a F508del seja a mutação mais frequente e a preconizada pelo programa nacional de triagem neonatal para o diagnóstico da FC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; BIEGER et al., 2012), outras mutações podem estar envolvidas. Em análise de pacientes brasileiros com FC, Raskin e colaboradores (1999) mostraram que a F508del e outras 4 mutações (G542X, N1303K, G551D e R553X) representaram 56% dos alelos de FC. Segundo o Registro Brasileiro de

Fibrose Cística, 2014, as 4 mutações não F508del mais frequentes foram G542X (4,33%), 3120+1G>A (1,18%), R334W (1,12%) e R1162X (1%).

Em Santa Catarina observamos 5 mutações (G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) com frequência alélica superior a 1%, que em conjunto com a mutação F508del totalizaram 65,04% dos alelos caracterizados (Tabela 9). Analisando-se somente a mutação F508del, a taxa de detecção foi de 51,33%, desta forma a utilização de estratégias baseadas na análise adicional de outras mutações do gene *CFTR* permite aumentar a acuidade do diagnóstico da FC, melhorando o valor preditivo dos programas de rastreio como o teste de triagem neonatal e o teste do suor (CABELLO et al., 2003; ROSENSTEIN et al., 2003).

Portanto, excluindo-se os alelos que não puderam ser identificados (30,97% dos casos), as 6 mutações (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) com maior frequência encontradas em nosso estudo representaram 94% dos alelos identificados (Figura 6). Em nossa casuística, a mutação G542X foi identificada em 4,87% dos alelos analisados (Tabela 9). Frequência semelhante às encontradas nos estudos de Alvarez et al. (2004), Cabello et al., (2005), Friedrich (2007), Faucz et al., (2007), Perone et al. (2010) e Coutinho et al. (2013), que respectivamente foram: 4,2%, 2,1%, 4,1%, 6,3%, 4,5% e 4,3%. Mundialmente, a mutação G542X é a segunda mais frequente (2,4%), sendo mais prevalente na Itália e Espanha ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)).

As outras 4 mutações (R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) verificadas em nosso estudo apresentaram a mesma frequência alélica de 2,21%. Numa investigação realizada em fibrocísticos na cidade do Rio de Janeiro, Cabello et al. (2001) identificaram a mutação R334W como a responsável pela doença em 2,6% dos indivíduos analisados, cujos resultados foram similares ao do presente estudo e de Bernardino et al. (2000) em amostra de São Paulo. No Rio Grande do Sul, esta mutação, mais encontrada no sul da Europa, foi detectada em 1,3% de indivíduos analisados (STREIT et al., 2003).

A frequência detectada da mutação R1162X em nossa pesquisa foi semelhante à encontrada no Estado do Paraná. Dos 100 alelos analisados apenas dois (2%) apresentaram a mutação, comum na Itália (RASKIN et al., 2003). Coutinho et al. (2013) também verificaram esta mutação em 2,4% dos alelos em pacientes no Estado de São Paulo.

A N1303K é a quarta mutação mundialmente mais frequente (1,3%), sendo mais prevalente na Itália ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)). Na presente pesquisa foi identificada em 2,21% dos 226 alelos analisados. Bernardino et al. (2000) e Coutinho et al. (2013) encontraram as seguintes frequências, respectivamente, 2,5% e 1,43%. Enquanto Raskin et al. (2003) e Faucz et al. (2007) identificaram esta mutação em 5,21% e 4,5% dos alelos, respectivamente.

A mutação 3120+1G>A é a mais prevalente (46%) na África (GOLDMAN et al., 2001) e a segunda mais prevalente (9-14%) em americanos afrodescendentes, perdendo em frequência apenas para a F508del (MACEK JUNIOR et al., 1997; MASEKELA et al., 2013). No Brasil, Cabello et al. (2001), foram os primeiros a reportar essa mutação em 5 pacientes (6,7%) no Rio de Janeiro. No Estado da Bahia, onde a população é bastante miscigenada esta mutação foi encontrada em 4 pacientes (9%) (MOTA, 2015) e em Minas Gerais em 9 pacientes (4,05%) (PERONE et al., 2010). No Estado de Santa Catarina, onde a maioria é de origem caucasóide, esta mutação foi encontrada em 5 pacientes (2,21%), o que presumivelmente emergiu de mistura étnica com afrodescendentes.

As demais mutações detectadas em Santa Catarina mostraram as seguintes frequências (Tabela 9): CFTR dele2,3 (21 kb) (0,88%), R553X (0,44%), 1717-1G>A (0,44%), 2183AA>G (0,44%), I507del (0,44%), R1066C (0,44%), W1282X (0,44%) e Y1092X (0,44%). CFTR dele2,3 (21 kb) é uma mutação de origem eslava (DORK et al., 2000) e não há relatos de sua descrição no Brasil. As mutações R553X, 1717-1G>A, I507del e R1066C são de origem européia e no Brasil foram, respectivamente, identificadas em 0,28%, 0,22%, 0,12% e 0,28% dos alelos analisados (CASTELLANI et al., 2008; REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014). A 2183AA>G foi encontrada pela primeira vez em três pacientes com FC de origem sardenha ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)) e no Brasil a frequência observada foi de 0,25% (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014). A W1282X é uma mutação de origem Judaica-Ashkenazi (ZIELENSKI e TSUI, 1995) encontrada em 0,50% dos alelos analisados no Brasil (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014). A mutação Y1092X foi identificada pela primeira vez na população canadense francesa (BOZON et al., 1994; PEREIRA et al., 1999) e no Brasil foi observada com uma frequência de 0,19% (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014).

Segundo as diretrizes do programa nacional de triagem neonatal somente a identificação de duas mutações patogênicas no gene *CFTR*, uma em cada alelo, confirma o diagnóstico molecular (REIS e DAMACENO, 1998). Em nosso estudo, observamos que 30,97% (Tabela 10) dos pacientes tiveram o diagnóstico molecular definido pela mutação F508del, este baixo percentual de pacientes com teste genético confirmado por duas mutações também foi verificado em pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul (STREIT et al., 2003), São Paulo (COUTINHO et al., 2013), Minas Gerais (PERONE et al., 2010) e Rio de Janeiro (OKAY et al., 2005) onde pacientes homozigotos para a mutação F508del totalizaram, respectivamente, 31,2%, 30%, 26,13% e 10,81% dos casos de FC.

No entanto, dos genótipos definidos de nossa pesquisa 6 mutações (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A), quando em combinação, apresentaram potencial para definir o diagnóstico molecular em 89,83% dos pacientes fibrocísticos catarinenses (Tabela 10). Este achado é particularmente importante, pois a presença de determinadas mutações no gene *CFTR* contribuem na determinação da gravidade das manifestações clínicas da doença (CASTELLANI et al., 2008). A mutação F508del, por exemplo, está associada às manifestações clínicas graves de FC, entretanto, existe uma grande variabilidade do grau de comprometimento da doença entre as pessoas que apresentam esta mutação em homozigose e quando em combinação com mutações das classes IV, V ou VI do gene *CFTR* (OOI et al., 2011). Além disso, o conhecimento da identidade genética de cada paciente pode contribuir para um tratamento individualizado e não padronizado (SLOANE e ROWE, 2010).

Neste contexto, no mercado internacional novos medicamentos estão sendo utilizados com êxito na modulação da proteína CFTR, agindo de maneira mutação-específica (CASTRO e FIRMIDA, 2011), o que depõe contra o rastreamento molecular de uma única mutação em Santa Catarina e no Brasil. As mutações de classe I (G542X, R1162X e 3120+1G>A) identificadas em nosso estudo, embora apresentem baixa frequência, vale ressaltar que estudos em modelos animais e humanos têm sido promissores para novos fármacos corretores da função da CFTR para essas mutações, entre eles, PTC124 (FLUME et al., 2012).

Ao contrário da mutação F508del, também de classe II, com alta frequência, a N1303K apresentou baixa prevalência (2,21% dos alelos analisados). Para essa classe de mutação, fármacos corretores e

potenciadores da função da CFTR têm sido pesquisados, tais como VX-770 e VX-809 (FLUME et al., 2012; COUTINHO et al., 2013).

A G551D de classe III é a terceira mutação, mundialmente, mais prevalente (1,6%), sendo encontrada com frequência na população inglesa ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/)). Em nosso estudo não foi identificada, entretanto, é uma das mutações mais pesquisadas no Brasil, com frequência diversificada entre os Estados: Pará (3%), até regiões onde também não foi detectada como Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio grande do Sul (RASKIN et al., 2003; STREIT et al., 2003; ARAUJO et al., 2005; PERONE et al., 2010; COUTINHO et al., 2013). Para esta mutação, está disponível no mercado internacional o fármaco VX-770, conhecido como kalydeco (COUTINHO et al., 2013; CFF, 2015).

Mesmo com a melhora da sensibilidade do teste genético, incluindo-se mutações além da F508del, uma grande parcela dos pacientes com FC será portador de uma mutação não identificada (PEREZ et al., 2007). Portanto, a investigação de outras mutações não observadas em Santa Catarina como a G551D, porém frequentes no Brasil, podem contribuir para aumentar a taxa de detecção e possibilitar o uso de terapias personalizadas.

Desta forma, a determinação do perfil mutacional da população de Santa Catarina é um dado de extrema importância não apenas para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico molecular eficientes, mas também para que, com o conhecimento das mutações características da população catarinense, possa ser criada uma diretriz que auxilie no manejo ambulatorial e tratamento dos afetados.

## **7.2 PAINEL DE 6 MUTAÇÕES**

Nos Estados Unidos o rastreamento mutacional para FC é realizado através de um painel que identifica as 23 mutações mais comuns na população norte-americana. A taxa de detecção de portadores para FC através deste painel varia de acordo com a origem étnica, sendo 94% em judeus Ashkenazi, 88% em brancos não hispânicos, 72% em hispânicos, 65% em afro-americanos e 49% em americanos de origem asiática (ACOG, 2011). Strom e colaboradores (2011), utilizando um painel de 32 mutações, observaram que a taxa de detecção não variou muito da obtida com painel de 23 mutações sendo 88% em judeus Ashkenazi,

86% em brancos não hispânicos, 75% em hispânicos, 63% em afro-americanos e 43% em americanos de origem asiática.

Em outro estudo realizado por Heim et al. (2001), nos Estados Unidos, utilizando painéis de 70 e 86 mutações a taxa de detecção de mutações no gene *CFTR* foi de 81% em americanos nativos, 85% em caucasianos de origem européia, 95% em judeus Ashkenazi, 58% em hispânicos, 62% em afro-americanos e 37% em americanos de origem asiática.

A população brasileira é ainda mais heterogênea do que a norte-americana, entretanto, em alguns centros de referência em FC o rastreamento mutacional é realizado através de kits de diagnóstico molecular importados, que são altamente específicos, porém, pouco sensíveis, ou seja, detectam, no máximo, 80 a 85% dos alelos de pacientes com FC (REIS e DAMACENO, 1998). A reduzida sensibilidade do método é devido à miscigenação racial, uma vez que as mutações causadoras da FC em países europeus e norte-americanos não são as mesmas verificadas no Brasil (RASKIN et al., 1993). Neste sentido, o conhecimento do perfil mutacional de cada população é o princípio crucial para o desenho e aplicação de qualquer nova estratégia em prol de avanços diagnósticos e terapêuticos.

Em Santa Catarina o estudo preliminar com um painel de 5 mutações (F508del, G542X, R334W, R1162X, N1303K e 3120+1G>A) teve um poder de detecção de 66,67% para mutações do gene *CFTR* (Tabela 15). Estudos anteriores realizados no Brasil utilizando painéis de mutações relataram uma taxa de detecção de 26% para 4 mutações no Pará (ARAÚJO et al., 2005), 42,5% para 5 mutações em São Paulo (PARIZOTTO e BERTUZZO, 1997), 57,9% para 6 mutações em São Paulo (COUTINHO et al., 2013), 68% para 8 mutações em Minas Gerais (PERONE et al., 2010) e 54,5% para 11 mutações no Rio Grande do Sul (STREIT et al., 2003).

Em Minas Gerais, Raskin et al. (2003) utilizando um painel de 70 mutações encontraram uma taxa de detecção de 75% em pacientes euro-brasileiros e de 21% em pacientes afro-brasileiros. No sul do Brasil, uma pesquisa envolvendo uma varredura completa do gene *CFTR*, por sequenciamento, detectou 95% dos alelos mutados no Estado de Santa Catarina e 73% dos alelos FC no Estado do Paraná (FAUCZ et al., 2007). Enquanto, no Rio de Janeiro foram detectados por sequenciamento 45,26% dos alelos mutados (CABELLO et al., 2005).

Adicionalmente, uma compilação de mutações do gene *CFTR* encontradas em países latino-americanos mostrou que um "painel mínimo" cobrindo as seis mutações mais freqüentes relatadas no Brasil (F508del, G542X, R1162X, W1282X, N1303K e R334W) teve um poder de detecção estimado de 53% (PEREZ et al., 2007). Desta forma, em países com alta heterogeneidade étnica, como o Brasil, e com baixa freqüência de F508del é necessário ter painéis de mutação específicos de região, permitindo um aumento da sensibilidade do painel para fins de diagnóstico e de programas de rastreio da FC (PERONE et al., 2010).

Neste contexto, o fato de o painel aqui apresentado ter detectado pelo menos um alelo mutado em todos os 21 doentes analisados com um poder de detecção de 66,67% (Tabelas 14 e 15) representa um aporte para o rastreio molecular da FC no Estado de Santa Catarina, aproximando-se ao poder de detecção de outras metodologias mais completas como painéis de mutações importados e sequenciamento gênico. Ademais, a técnica escolhida e empregada (PCR-ASO) para a detecção das 6 mutações mostrou-se simples e eficiente, o que a torna uma alternativa de diagnóstico molecular viável para a triagem da FC em Santa Catarina, uma vez que metodologias mais completas são inviáveis para auxiliar no diagnóstico confirmatório de FC no sistema público de saúde por apresentarem elevado custo por análise e por serem técnicas muito laboriosas.

### 7.3 SEQUENCIAMENTO

Poucos centros de referência no Brasil têm acesso a painéis de triagem de mutações mais extensos ou podem realizar o sequenciamento completo do gene para diagnóstico de casos atípicos da FC (DALCIN e ABREU, 2008). Geralmente, a metodologia de sequenciamento é empregada com maior frequência em trabalhos de pesquisa e na definição de um genótipo depois da utilização de outro sistema que detectou a presença de uma mutação (FRIEDRICH, 2007).

No presente estudo, dos 6 pacientes, que previamente realizaram o rastreamento molecular com painel 36 mutações, 3 tiveram o genótipo definido pelo sequenciamento, 2 tiveram o genótipo parcialmente definido e 1 não teve o genótipo definido por nenhuma das duas técnicas (Tabela 18). O uso combinado de técnicas moleculares não garante a detecção das duas mutações causadoras da doença em

todos os pacientes, cerca de 1 a 5% dos alelos permanecem indeterminados em pacientes com FC clássica, sendo que a frequência aumenta em pacientes com FC atípica (OOI et al., 2011).

A FC clássica abrange pacientes com ou sem insuficiência pancreática com história familiar, teste de triagem neonatal (IRT) acima de 70 ng/ml e dosagem de cloreto no suor maior que 60 mEq/l. Enquanto na doença não clássica ou atípica os achados fenotípicos são encontrados em pelo menos um órgão ou sistema, com dosagem de cloreto no suor normal - menor que 30mEq/l - ou limítrofe - 31 e 59 mEq/l (FARRELL et al, 2008; FARRELL et al., 2017).

Dentre os achados clínicos, deste estudo, a presença de insuficiência pancreática exócrina tendeu ser mais frequente nos casos com diagnóstico molecular confirmado (dados aqui não mostrados). Entretanto, outras características clínicas foram observadas nos pacientes como: íleo meconial, colonização broncopulmonar por germes sugestivos de FC, anormalidades gastrointestinais e nutricionais. A maioria dos casos (pacientes 25, 26, 28 e 31) apresentou teste de triagem neonatal acima de 70 ng/ml. Dos 3 pacientes com diagnóstico molecular definido pelo sequenciamento, 2 apresentaram teste do suor classificado como alterado (pacientes 26 e 31) e 1 não foi possível obter o resultado do teste (paciente 29). O paciente 28 com genótipo parcialmente definido também apresentou teste do suor alterado. Por outro lado, o teste do suor se apresentou normal em 1 dos 2 casos com uma mutação identificada (paciente 25) e no único caso em que a mutação não foi identificada (paciente 27), o teste do suor se mostrou alterado na primeira amostra e normal nas seguintes (Tabela 18).

Portanto, os 2 casos (pacientes 26 e 31) com diagnóstico genético de FC podem ser caracterizados como doença clássica, pois tinham o teste do suor alterado; enquanto 1 paciente com genótipo parcialmente definido (paciente 25) e 1 sem diagnóstico genético (paciente 27) podem ser caracterizados com doença atípica, pois tinham eletrólitos do suor com valores normais.

Com o avanço do conhecimento e com a disponibilidade da avaliação genética estendida, casos com maior dificuldade diagnóstica podem ser investigados (DALCIN e ABREU, 2008). Em nossa pesquisa, 6 pacientes de difícil diagnóstico e que previamente realizaram o rastreamento molecular com painel de 36 mutações foram selecionados para realizar o sequenciamento. No total, foram detectadas 9 alterações diferentes nas 6 amostras analisadas (Tabela 17).

A E92X é uma mutação de classe I, de origem germânica e nunca foi descrita no Brasil anteriormente. Esta mutação causa FC grave porque causa defeitos de *splicing* sem produção de proteína. Quanto aos achados fenotípicos, esta mutação está associada a doença típica com insuficiência pancreática e doença pulmonar crônica (WILL et al., 1994).

A P205S é uma mutação de classe IV, de origem hispânica e no Brasil apresenta frequência de 0,09% (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014). Cabello et al. (2005) e Marson et al. (2013) identificaram esta mutação, respectivamente, no Rio de Janeiro (1,05%) e São Paulo (0,6%). A mutação P205S produz um canal que responde ao monofosfato de adenosina cíclico com condutância reduzida, diminuindo assim o transporte de cloreto (WILSCHANSKI et al., 1995). Os pacientes com esta mutação podem apresentar insuficiência pancreática, baixos níveis de cloro no suor e dano pulmonar intermediário (ROWNTREE e HARRIS, 2003).

As mutações de classe II, F508del e R1066C, estão associadas à deficiência no processamento de proteínas, resultando em síntese da proteína CFTR que não é capaz de atingir a membrana apical (WELSH e SMITH, 1993; MARSON et al., 2013). A mutação F508del está associada à FC de maior gravidade clínica (DRUMM et al., 2012). Enquanto, pacientes com a mutação R1066C podem apresentar insuficiência pancreática ou função pancreática normal quando em combinação com uma mutação de classe leve (FANEN et al., 1997).

A 711+5G->A é uma mutação de classe I que causa defeitos de *splicing* sem produção de proteína, portanto, responsável pela insuficiência pancreática dos pacientes (BISCEGLIA et al, 1994; <http://www.genet.sickkids.on.ca>). Esta mutação é de origem hispânica (CASTELLANI et al., 2008) e no Brasil apresenta frequência de 0,03% (REGISTRO BRASILEIRO DE FC, 2014). Fauz et al. (2007) detectaram esta mutação no Paraná em 1,5% dos 68 alelos analisados.

A mutação de classe I, 3132delTG, causa modificação na sequência de leitura (*frameshift*), resultando em proteína truncada, instável e facilmente degradável (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Portanto, esta mutação está associada a fenótipos mais graves da doença. Existem poucos relatos na literatura sobre a frequência desta mutação em outros países, entretanto, Picci et al. (2010) observou uma frequência de 0,9% na população italiana. Segundo o Registro Brasileiro de FC, 2014, a frequência desta mutação é de 0,03%.

Os polimorfismos são variações de sequência que não causam FC, mas podem alterar a produção e a função da proteína CFTR. Mais de 200 polimorfismos já foram identificados no gene *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). A variante IVS8(TG)m (Tabela 17), encontrada em nosso estudo, é um polimorfismo que induz a perda do éxon 9 no *splicing* (CUPPENS et al., 1998). Este polimorfismo, também conhecido como sequência poliT, está localizado no íntron 8, e é uma sequência de polipirimidinas, compostas por 5, 7 ou 9 timinas em sequência, originando os alelos 5T, 7T ou 9T (CHU et al., 1993). Um menor número de timinas nessa região está associado com o aumento na frequência de perda do éxon 9 durante a transcrição do CFTR. Portanto, indivíduos homocigotos para o alelo 5T apresentam maior frequência (66 a 90%) de perda do éxon 9 em comparação aos homocigotos 7T (12 a 25%) e 9T (1 a 13%) (DAHL et al., 2005). O produto transcrito do *CFTR* sem o éxon 9 resulta em uma proteína mal dobrada e não funcional (RADPOUR et al., 2007).

Cinco dos 6 pacientes analisados apresentaram os alelos 7T e 9T (Tabela 18). Conforme descrito anteriormente, os transcritos derivados de alelos com 7 ou 9T apresentam baixos níveis de remoção do éxon 9 (DAHL et al., 2005). Deste modo, os pacientes incluídos neste estudo provavelmente não apresentaram fenótipo de FC influenciado pelo polimorfismo IVS8(TG)m.

O polimorfismo M470V presente no éxon 10 afeta a intensidade da doença e a função de transporte de ânion da proteína CFTR (LEE et al. 2003). Um indivíduo que seja portador de uma mutação causadora de FC em um alelo, produzindo proteína CFTR não funcional, e o polimorfismo M470V no outro alelo, encontra-se sujeito a uma redução da atividade transcricional do alelo não mutado, podendo apresentar um fenótipo moderado ou atípico de FC (ROWNTREE e HARRIS, 2003). Em nosso estudo, o paciente 25 apresentou esta característica (Tabela 18). Além disso, a variante M470V foi encontrada em maior frequência associada com a mutação F508del (VERA et al., 2005), como também observado no presente estudo. Na FC monossintomática, a M470V interfere na biogênese da proteína CFTR, aumentando em 1,7 vezes a atividade intrínseca do cloro. Portanto, em pacientes com FC, suficiente pancreático, o diagnóstico de pancreatite pode preceder um diagnóstico de FC atípica (DE BOECK et al., 2005).

A 406-6T->C foi descrita primeiramente na França e é relatada como possível polimorfismo, pois foi encontrada em uma criança com o

genótipo 406-6T->C/F508del, a qual não apresentava sintomas e o teste do suor era normal. Entretanto, esta variante também foi encontrada em um paciente sem nenhuma mutação identificada, suficiente pancreático, com sintomas respiratórios moderados e eletrólitos do suor com valor acima de 60 mEq/l (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). No presente estudo, o paciente 28 apresentou este polimorfismo associado a mutação R1066C, insuficiência pancreática e teste do suor alterado.

A presença de apenas uma mutação ou nenhuma encontrada na análise molecular não descarta o diagnóstico de FC. Casos de FC atípica em que nenhuma mutação foi encontrada já foram descritos (GROMAN et al., 2004). Por isso, mutações não detectadas, como observado em nosso estudo, podem estar em regiões que não são normalmente analisadas, como sequências regulatórias distantes ou regiões promotoras, ou então dever-se a mutações e/ou polimorfismos em genes modificadores como *TNF- $\alpha$*  e *MBL2* (DEQUEKER et al., 2009; CULLING e OGLE, 2010).

Os genes modificadores podem agir por diferentes vias na modulação da gravidade e variabilidade clínica da FC, sendo as principais possibilidades: (1) em células ou tecidos específicos, ou ter ação sistêmica; (2) efeitos qualitativos ou quantitativos, ambos em nível da proteína ou no fenótipo da doença; (3) ação específica na apresentação da doença, bem como ação inespecífica; (4) ação direta ou controlada sobre a mutação que acarreta a doença, bem como, sobre condições ambientais específicas (SONTAG e ACCURSO, 2004; SLIEKER et al., 2005).

Existe variabilidade fenotípica na expressão da FC em relação ao genótipo dos pacientes (CUTTING, 2010), não sendo observada correlação estrita entre mutações específicas no gene *CFTR* e o fenótipo (VANKEERBERGHEN et al., 2002), diferença esta, explicada pela interação do ambiente e de fatores genéticos adicionais acerca do fenótipo (STANKE et al., 2011). Cerca de 2% da população mundial é portadora assintomática de mutações no gene *CFTR* (MARSON et al., 2013), no entanto, genes modificadores e polimorfismos genéticos podem estar envolvidos na penetrância fenotípica da doença (GROMAN et al., 2004). No presente estudo, o paciente 27 apresentou-se assintomático, nenhuma mutação no gene *CFTR* foi identificada pela técnica utilizada, porém apresentou dois polimorfismos M470V e IVS8(TG)m que podem estar relacionados com a penetrância fenotípica da FC. Entretanto, investigações adicionais de mutações no gene *CFTR*

por outras técnicas de sequenciamento precisariam ser realizadas, bem como a pesquisa de genes modificadores.

Na população de pacientes com achados compatíveis de FC a análise molecular da região codificante do gene *CFTR* contribuiu para o diagnóstico definitivo da doença em 3 casos, sendo que 2 casos apresentaram teste do suor alterado; e possibilitou a identificação de um alelo mutado em um paciente com teste do suor normal (Tabela 18). Os pacientes sem mutações identificadas, provavelmente possuem alterações ainda não detectáveis pela técnica molecular utilizada.

Com base no exposto, a investigação diagnóstica de FC requer testes diagnósticos adicionais ao teste do suor, pois este não possui especificidade suficiente para excluir a doença neste grupo de pacientes. Neste contexto, a pesquisa genética expandida com a detecção de mutações além da F508del é imprescindível para a correlação genótipo/fenótipo, possibilitando o diagnóstico das formas atípicas da doença e um melhor monitoramento dos pacientes.

Entretanto, painéis de sequenciamento, além de serem dispendiosos, são técnicas inapropriadas para detectar mutações raras, pois as mutações de FC não são igualmente distribuídas entre as diferentes populações. Ademais, um dos obstáculos para estudos abrangentes do gene *CFTR* é a sua grande dimensão, compreendendo 27 éxons com elevado número de mutações e polimorfismos, bem como regiões intrônicas e reguladoras, que normalmente não são avaliadas por apresentarem variantes de frequência rara (WEISS et al., 2005; CASTELLANI et al., 2008).

## 8 PERSPECTIVAS

- Pode-se estimar que os dados resultantes do presente estudo abrirão um leque de oportunidades que, imediata ou futuramente, poderão repercutir em inúmeras externalidades positivas como: antecipar o diagnóstico da FC, reduzindo a defasagem entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico definitivo; aumentar a taxa de diagnóstico molecular; facilitar o tratamento dos portadores da FC; diminuir a possibilidade de internações recorrentes; barateamento dos exames de diagnóstico molecular da FC; aumentar a investigação de portadores e possibilitar o aconselhamento genético aos casais e familiares em relação a futuras gestações e, finalmente, grande impacto social para a população catarinense no aumento da sobrevida dos pacientes;
- Será desenvolvido e validado um Kit diagnóstico para FC para a detecção das 6 mutações selecionadas com a menor laboriosidade e custo por análise possível, sem perder a sensibilidade esperada;



## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N.; FREDERICK, M.; PICKERING, C.; BETTEGOWDA, C.; CHANG, K.; LI, R.; LI, R.J.; et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. **Science.**; v. 333, p.1154-1157, 2011.
- ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J. Pediatr.**, v.80(5), p. 344-346, 2004.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS COMMITTEE ON GENETICS (ACOG). Committee Opinion No. 486: Update on Carrier screening for cystic fibrosis. **Obstet Gynecol.**, v.117(4), p.1028-1031, 2011.
- ARAÚJO, F.G.; NOVAES, F.C.; SANTOS, N.P.; MARTINS, V.C.; SOUZA, S.M.; SANTOS, S.E.; et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. **Braz J Med Biol Res.**,v.38(1), p.11-15, 2005.
- ARKWRIGHT, P.D., LAURIE, S., SUPER, M., PRAVICA, V., SCHWARZ, M.J., WEBB, A.K.; et al. TGF-beta (1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. **Thorax**, v. 55 (6), p. 459-62, 2000.
- BARRETO, C.; PEREIRA, L. Como interpretar as provas de suor com valores borderline no diagnóstico de fibrose cística. **Acta Pediatr.**, v. 35, p. 261-266, 2004.
- BARTOSZEWSKI, R.A.; JABLONSKY, M.; BARTOSZEWSKA, S.; STEVENSON, L.; DAI, Q.; KAPPES, J.; et al. A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. **The Journal of biological chemistry**, v.285, p.28741-28748, 2010.

BEAUCHAMP, M.; LANDS, L.C. Sweat-testing: a review of current technical requirements. **Pediatr Pulmonol.**, v.39(6), p.507-511, 2005.

BELCHER, C.N.; VII, N. Protein Processing and Inflammatory Signaling in Cystic Fibrosis: Challenges and Therapeutic Strategies. **Current Molecular Medicine**, v.10, p.82-94, 2010.

BERNARDINO, A.L.; FERRI, A.; PASSOS-BUENO, M.R.; KIM, C.E.; NAKAIE, C.M.; GOMES, C.E; et al. Molecular Analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. **Genet Test.**, v. 4(1), p.69-74, 2000.

BIEGER, A. M.; MARSON, F. A. L.; BERTUZZO, C. S. Prevalence of DF508 mutation in the cystic fibrosistransmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral Center. **J Pediatr.**; v.88(6), p.531-534, 2012.

BISCEGLIA, L.; GRIFA, A.; ZELANTE, L.; GASPARINI, P. Development of RNA-SSCP protocols for the identification and screening of CFTR mutations: identification of two new mutations. **Hum Mutat.**, v.4(2), p.136-140, 1994.

BOBADILLA, J.L.; MACEK, M., JR.; FINE, J.P.; FARRELL, P.M. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. **Human mutation.**, v.19, p.575-606, 2002.

BOESENBERG-SMITH, K. A.; PESSARAKLI, M. M.; WOLK, D. M. Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. **Clinical Microbiology Newsletter.**; v. 34(1), p. 1-6, 2012.

BOROWITZ, D.; ROBINSON, K.A.; ROSENFELD, M.; DAVIS, S.D.; SABADOSA, K.A.; SPEAR, S.L.; et al. Cystic Fibrosis Foundation evidence-based guidelines for management of infants with cystic fibrosis. **J Pediatr.**, v.155(6 Suppl), p.73-93, 2009.

BOZON, D.; ZIELENSKI, J.; RININSLAND, F.; TSUI, L.C. Identification of four mutations in the cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator gene: I148T, L1077P, Y1092X, 2183AA→G. **Hum. Mut.**, v.3, p. 330-332, 1994.

BREDEMEIER, J.A **experiência de crescer com fibrose cística: investigações sobre qualidade de vida.** Porto Alegre, 2005. 151p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Psicologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRENNAN, M.L.; SCHRIJVER, I. Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas. **J Mol Diagn.**, v.18(1), p.3-14, 2016.

BREWINGTON, J.; CLANCY, J.P. Diagnostic Testing in Cystic Fibrosis. **Clin Chest Med.**, v.37(1), p.31-46, 2016.

BRODLIE, M.; HAQ, I.J.; ROBERTS, K.; ELBORN, J.S. Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis. **Genome Med.**, v.7, p.101. 2015.

CABELLO, G.M.; MOREIRA, A.F.; HOROVITZ, D.; CORREIA, P.; SANTA ROSA, A.; LLERENA, J.R.; et al. Cystic fibrosis: low frequency of DF 508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. **Hum Biol.**, v.71, p.189-196, 1999.

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

CABELLO, G.M.; CABELLO, P.H.; ROIG, S.R.S.; FONSECA, A.; CARVALHO, E.C.D.; FERNANDES, O. Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação DF508. **J Bras Patol Med Lab.**, v.39(1), p. 15-20, 2003.

CABELLO, G.M.; CABELLO, P.H.; OTSUKI, K.; GOMBAROVITS, M.E.; LLERENA, J.C. JR.; FERNANDES, O. Molecular analysis of 23

exons of the CFTR gene in Brazilian patients leads to the finding of rare cystic fibrosis mutations. **Hum. biol.**, v. 77(1), p.125-135, 2005.

CABELLO, G.M.. Avanços da Genética na Fibrose Cística. **Revista HUPE.**, v. 10(4), p. 36-45, 2011.

CANADIAN CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2014. Disponível em: <http://www.cysticfibrosis.ca/page.asp?id=21>. Acessado em 19 de dezembro de 2016.

CASTELLANI, C.; CUPPENS, H.; MACEK, M.J.R.; CASSIMAN, J.J.; KEREM, E.; DURIE, P.; et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. **J Cyst Fibros.**, v.7(3), p.179-96, 2008.

CASTELLANI, C.; SOUTHERN, K.W.; BROWNLEE, K.; ROELSE, J.D.; DUFF, A.; FARREL, M.; et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. **J Cystic Fibrosis.**, v.8, p.153-173, 2009.

CASTRO, M. C. S.; FIRMIDA, M.C. O Tratamento na Fibrose Cística e suas Complicações. **Revista HUPE.**, v. 10(4), p. 82-108, 2011.

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.

COUTINHO, C.A.A.C.; MARSON, F.A.L.; RIBEIRO, A.F.; RIBEIRO, J.D.; BERTUZZO, C.S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis. **J Bras Pneumol.**, v.39(5), p.555-561, 2013.

COUTINHO, C.A.; MARSON, F.A.; MARCELINO, A.R.; BONADIA, L.C.; CARLIN, M.P.; RIBEIRO, A.F.; et al. TNF- alpha polymorphisms as a potential modifier gene in the cystic fibrosis. **J. Epidemiol. Mol. Genet**, v.5(2), p. 87-99, 2014.

CULLING, B.; OGLE, R. Genetic counselling issues in cystic fibrosis. **Paediatr Respir Rev.**, v.11(2), p.75-79, 2010.

CUPPENS, H.; LIN, W.; JASPERS, M.; COSTES, B.; TENG, H.; VANKEERBERGHEN, A.; et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. **J Clin Invest.**, v.101(2), p.487-496, 1998.

CUTTING, G.R. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v.1214, p. 57–69, 2010.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION (CFF). About cystic fibrosis. Disponível em: <<http://www.cff.org:80/> AboutCF/>. Acessado em 29 de março de 2015.

CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE (CFTR1). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>. Acessado em 20 de janeiro de 2015.

DAHL, M.; TYBJAERG-HANSEN, A.; LANGE, P.; NORDESTGAARD, B.G. Asthma and COPD in cystic fibrosis intron-8 5T carriers. A population-based study. **Respir Res.**, v.6, p.113, 2005.

DALCIN, P.T.; ABREU e SILVA, F.A. Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects. **J Bras Pneumol**, v.34(2), p.107 – 117, 2008.

DAVIS, P.B. Cystic fibrosis since 1938. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.173, p. 475-482, 2006.

DE BOECK, K.; WEREN, M.; PROESMANS, M.; KEREM, E. Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. **Pediatrics**, v.115, p. 463-469, 2005.

DE BOECK, K.; AMARAL, M.D. Progress in therapies for cystic fibrosis. **Lancet Respir Med.**, v.4(8), p.662-674, 2016.

DEQUEKER, E.; STUHRMANN, M.; MORRIS, M.A.; CASALS, T.; CASTELLANI, C.; CLAUSTRES, M.; et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. **European journal of human genetics**, v.17, p.51-65, 2009.

DOMINGOS, M.T.; MAGDALENA, N.I.; CAT, M.N.; WATANABE, A.M.; ROSÁRIO FILHO, N.A. Sweat conductivity and coulometric quantitative test in neonatal cystic fibrosis screening. **J Pediatr.**, v.91(6), p.590-595, 2015.

DOULL, I. Cystic Fibrosis Papers of the Year 2015. **Paediatr Respir Rev.**, v.20, p.18-20, 2016.

DRUMM, M.L.; ZIADY, A.G.; DAVIS, P.B. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. **Annu Rev Pathol.**,v.7, p.267-282, 2012.

EDELMANN, L.; HASHMI, G.; SONG, Y.; HAN, Y.; KORNREICH, R.; DESNICK, R.J. Cystic fibrosis carrier screening: validation of a novel method using BeadChip technology. **Genet Med.**, v.6(5), p.431-438, 2004.

EGAN, M.E. Genetics of Cystic Fibrosis: Clinical Implications. **Clin Chest Med.**, v.37(1), p.9-16, 2016.

ERLINGER ,S. Molecular repair of a defective CFTR protein in cystic fibrosis. **Clin Res Hepatol Gastroenterol.**,; v.35, p.254-256, 2011.

FANEN, P.; LABARTHE, R.; GARNIER, F.; BENHAROUGA, M.; GOOSSENS, M.; EDELMAN, A. Cystic fibrosis phenotype associated with pancreatic insufficiency does not always reflect the camp-dependent chloride conductive pathway defect. **The journal of biological chemistry**, v.272(48), p.30563-30566, 1997.

FARRELL, P.M.; ROSENSTEIN, B.J.; WHITE, T.B.; ACCURSO, F.J.; CASTELLANI, C.; CUTTING, G.R.; et al. Guidelines for diagnosis of

cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. **J Pediatr.**, v. 153(2), p. S4-S14, 2008.

FARRELL, P.M.; WHITE, T.B.; DERICHS, N.; CASTELLANI, C.; ROSENSTEIN, B.J. Cystic Fibrosis Diagnostic Challenges over 4 Decades: Historical Perspectives and Lessons Learned. **J Pediatr.** v.181, p.S16-S26, 2017.

FAUCZ, F.R.; GIMENEZ, J.; RAMOS, M.D.; PEREIRA-FERRARI, L.; ESTIVILL, X.; RASKIN, S.; CASALS, T.; et al. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. **Clin. genet.**,v. 72(3), p.218-223, 2007.

FAUCZ, F.R.; SOUZA, D.A.S.; OLANDOSKI, M.; RASKIN, S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. **J Hum Genet.**, v.55, p.71-76, 2010.

FEREC, C.; CUTTING, G.R. Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v.2(12), p.a009480, 2012.

FIRMIDA, M. C.; LOPES, A. J. Aspectos Epidemiológicos da Fibrose Cística. **Revista HUPE.**, v. 10(4), p. 12-22, 2011.

FLUME, P. A.; VAN DEVANTER, D. R. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. **BMC Medicine.**, v.10(88), p. 2-12, 2012.

FLUME, P.A.; LIOU, T.G.; BOROWITZ, D.S.; LI, H.; YEN, K.; ORDO-EZ, C.L.; et al. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. **Chest.**, v.142(3), p.718-724, 2012.

FOLESCU, T.; COHEN, R. Avanços no Diagnóstico da Fibrose Cística – Visão Crítica? **Revista HUPE.**, v. 10(4), p. 59-65, 2011.

FRANCKX, H.; VERBRUGGEN, T.; LESSIRE, F.; DEREPPER, S.; CHAPELLE, A.C.; DE GUCHTENAERE, A.; \_et al. The effect of a

short-stay revalidation program on lung function parameters and weight. **J Cyst Fibros.** v.14, p.S99-S99, 2015.

FRENTESCU, L.; BROWNSSELL, E.; HINKS, J.; MALONE, G.; SHAW, H.; BUDIŞAN, L.; et al. The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania. **J Cyst Fibros.**, v.7(5), p. 423-428, 2008.

FRIEDRICH, D.C. **Análise molecular de mutações frequentes em pacientes com suspeita clínica de Fibrose Cística.** Rio Grande do Sul, 2007. 69p. Dissertação - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. GOLDMAN, A.; LABRUM, R.; CLAUSTRES, M.; DESGEORGES, M.; GUITTARD, C.; WALLACE, A.; et al. The molecular basis of cystic fibrosis in South Africa. **Clin Genet.**, v.59 (1), p.37-41, 2001.

GRAVINA, L.P.; CRESPO, C.; GIUGNO, H.; SEN, L.; CHERTKOFF, L.; MANGANO, A.; et al. Mannose-binding lectin gene as a modifier of the cystic fibrosis phenotype in Argentinean pediatric patients. **J Cyst Fibros.**, v.14(1), p.78-83, 2015.

GREEN, A.; KIRK, J. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. **Ann clin biochem.**, v. 44, p. 25-34, 2007.

GROMAN, J.D.; HEFFERON, T.W.; CASALS, T.; BASSAS, L.; ESTIVILL, X.; DES GEORGES, M.; et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. **Am J Hum Genet.**, v.74(1), p.176-179, 2004.

HAMMOND, K.B.; ABMAN, S.H.; SOKOL, R.J.; ACCURSO, F.J. Efficacy of statewide neonatal screening for cystic fibrosis by assay of trypsinogen concentrations. **New Engl J Med.**, v.325, p.769-774, 1991.

HEIM, R.A.; SUGARMAN, E.A.; ALLITTO, B.A. Improved detection of cystic fibrosis mutations in the heterogeneous U.S. population using an expanded, pan-ethnic mutation panel. **Genet Med.**, v.3(3), p.168-176, 2001.

HUFFMYER, J.L.; LITTLEWOOD, K.E.; NEMERGUT, E.C.  
Perioperative management of the adult with cystic fibrosis. **Anesthesia and analgesia.**, v. 109, p.1949-1961, 2009.

HULL, J. Basic science of cystic fibrosis. **Current Paediatr.**, v.13, p. 253-258, 2003.

ISHII, K.; FUKUI, M. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67(8), p. 3753-3755, 2001.

KAMPKE, T.; KIENINGER, M.; MECKLENBUG, M. Efficient primer design algorithms. **Bioinformatics.**, v.17(3), p.214-225, 2001.

KIEHL, M.F. **Identificação de variações de sequência no gene CFTR em pacientes com fibrose cística.** Porto Alegre, 2010. 69p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

KLOOSTERBOER, M.; HOFFMAN, G.; ROCK, M.; GERSHAN, W.; LAXOVA, A.; LI, Z. et al. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. **J Pediatr.**, v.123(2), p. 338-346, 2009.

KREINDLER, J. L. Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. **Pharmacol Ther.**, v.125(2), p.219-229, 2010.

KRISTIDIS, P.; BOZON, D.; COREY, M.; MARKIEWICZ, D.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C.; et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. **Am J Hum Genet.**, v.50 (6), p.1178 – 1184, 1992.

LEE, J.H.; CHOI, J.H.; NAMKUNG, W.; HANRAHAN, J.W.; CHANG, J.; SONG, S.Y.; et al. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. **Hum Mol Genet.**, v.12(18), p.2321-2332, 2003.

LEGRYS, V.A.; YANKASKAS, J.R.; QUITTELL, L.M.; MARSHALL, B.C.; MOGAYZEL, P.J. JR.; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. **J Pediatr.**, v.151(1), p.85-89, 2007.

LEIGH, M.W. Diagnosis of CF despite normal or borderline sweat chloride. **Paediatr Respir Rev.**, v.5, p.357-359, 2004.

LEMOS, A. C. M.; MATOS, E.; FRANCO, R.; SANTANA, P.; SANTANA, M. A. Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. **J Bras Pneumol.**, v.30(1), p. 9-13, 2004.

LI, C.; NAREN, A.P. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. **Pharmacol Ther.**, v.108(2), p.208-223, 2005.

LUBAMBA, B.; DHOOGHE, B.; NOEL, S.; LEAL, T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. **Clinical biochemistry.**, v. 45, p. 1132-1144, 2012.

LYON, E.; MILLER, C. Current challenges in cystic fibrosis screening. **Arch Pathol Lab Med.**, v.127(9), p.1133-1139, 2003.

MACEK, M. J.R, MACKOVA, A.; HAMOSH, A.; HILMAN, B.C.; SELDEN, R.F.; LUCOTTE, G.; et al. Identification of common cystic fibrosis mutations in African Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. **Am J Hum Genet**, v.60(5), p.1122-1127, 1997.

MARDIS, E.R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v.9, p.387-402, 2008.

MARDIS, E.R. Next-generation sequencing platforms. **Annu Rev Anal Chem.**, v.6, p.287-303, 2013.

MARSON, F.A.; BERTUZZO, C.S.; RIBEIRO, M.A.; RIBEIRO, A.F.; RIBEIRO, J.D. Screening for F508del as a first step in the molecular

diagnosis of cystic fibrosis. **J. bras. pneumol.**, v. 39(3), p. 306-316, 2013.

MASTELLA, G. Sweat testing: can the conductivity analysis take the place of the classic Gibson and Cooke technique? **J Pediatr.**, v. 86(2), p.89-91, 2010.

MATTAR, A.C.; GOMES, E.N.; ADDE, F.V.; LEONE, C.; RODRIGUES, J.C. Comparison between classic Gibson and Cooke technique and sweat conductivity test in patients with and without cystic fibrosis. **J Pediatr.**, v.86(2), p.109-114, 2010.

MASEKELA, R.; ZAMPOLI, M.; WESTWOOD, A.T.; WHITE, D.A.; GREEN, R.J.; OLORUNJU, S.; et al. Phenotypic expression of the 3120+1G>A mutation in non-Caucasian children with cystic fibrosis in South Africa. **J Cyst Fibros.**, v.12(4), p.363-366, 2013.

MCKONE, E.F.; GOSS, C.H.; AITKEN, M.L. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. **Chest**, v.130, p.1441-1447, 2006.

MERRIMAN, B.; ION TORRENT, R&D TEAM; ROTHBERG, J.M. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. **Electrophoresis.**, v.33(23), p.3397-3417, 2012.

METZKER, M.L. Sequencing technologies - the next generation. **Nat Rev Genet.**, v.11(1), p.31-46, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001.** Institui Programa Nacional de Triagem Neonatal - PNTN. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2001 jun. 07; Seção 1. p. 33.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal.** Brasília: Ministério da Saúde; 2004. v. 2. 128p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

MOSKOWITZ, S.M; CHMIEL, J.F.; STERNEN, D.L.; CHENG, E.; GIBSON, R.L.; MARSHALL, S.G.; et al. Clinical practice and genetic

counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. **Genet Med**, v.10(12), p. 851-868, 2008.

MOTA, L. R. **Estudo de Mutações no Gene CFTR em Pacientes com Fibrose Cística de um Centro Universitário de Referência em Salvador-BA**. Salvador, 2015. 130p. Dissertação – Universidade Federal da Bahia.

NOOIJER, R.A.; NOBEL, J.M.; ARETS, H.G.; BOT, A.G.; VAN BERKHOUT, F.T.; DE RIJKE, Y.B.; et al. Assessment of CFTR function in homozygous R117H-7T subjects. **J Cyst Fibros.**, v.10(5), p.326-332, 2011.

NUNES, A. K. C.; WACHHOLZ, R. G.; ROVER, M. R. M.; SOUZA, L. C. Prevalência de patologias detectadas pela triagem neonatal em Santa Catarina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.57(5), p.360-367, 2013.

OOI, C.Y.; DORFMAN, R.; CIPOLLI, M.; GONSKA, T.; CASTELLANI, C.; KEENAN, K.; et al. Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. **Gastroenterology**, v.140, p.153-161, 2011.

OKAY, T.S.; OLIVEIRA, W.P.; RAIZ-JÚNIOR, R.; RODRIGUES, J.C.; DEL NEGRO, G.M. Frequency of the DF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported brazilian data. **Clinics.**, v.60(2), p.131-134, 2005.

O'SULLIVAN, B.P.; FREEDMAN, S.D. Cystic fibrosis. **Lancet.**, v. 373, p. 1891-1904, 2009.

PARAD, R.B.; COMEAU, A.M. Newborn screening for cystic fibrosis. **Pediatr Ann.**, v.32(8), p. 528-35, 2003.

PEREIRA, L.; RASKIN, S.; FREUND, A.A.; RIBAS, P.D.; CASTRO, R.M.V.; PIGNATTI, P.F.; et al. Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA>G in two southern brazilian states. **Genetics and Molecular Biology**, v.22(3), p. 291-294, 1999.

PEREZ, M.M.; LUNA, M.C.; PIVETTA, O.H.; KEYEUX, G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. **J Cyst Fibros.**, v. 6(3), p. 194-208, 2007.

PARIZOTTO, E.; BERTUZZO, C.S.; RIBEIRO AF. Molecular characterization of cystic fibrosis patients in the State of São Paulo (Brazil). **J. hum. genet.**, v. 34(10), p.877, 1997.

PERONE, C.; MEDEIROS, G.S.; DEL CASTILLO, D.M.; DE AGUIAR, M.J.; JANUÁRIO, J.N. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. **Braz J Med Biol Res.**, v. 43(2), p. 134-138, 2010.

PICCI, L.; CAMERAN, M.; MARANGON, O.; MARZENTA, D.; FERRARI, S.; FRIGO, A.C.; et al. A 10-year large scale cystic fibrosis carrier screening in the Italian population. **J Cyst Fibros.**, v.9(1), p.29-35, 2010.

PROGRAMA DE TRIAGEM NEONATAL DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA (PTN -SC). Florianópolis: Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina (LACEN/SC); 2016. (Relatório Anual de Triagem Neonatal).

RADPOUR, R.; GOURABI, H.; GILANI, M.A.; DIZAJ, A.V. Molecular study of (TG)m(T)n polymorphisms in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. **J Androl.**, v.28(4), p.541-547, 2007.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.S.; VNENCAK-JONES, C.; PARKER, R.A.; ROZOV, T et al. 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, J.A.; KAPLAN, G.; MCCLURE, M.; VNENCAK-JONES, C.; ROZOV, T.; et al. Geographic heterogeneity of 4 common worldwide cystic fibrosis non-DF508 mutations in Brazil. **Hum Biol.**, v.71(1), p.111-121, 1999.

RASKIN, S.; PEREIRA, L.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N.; VALENTIM, L.; et al. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. **Genet Test.**, v.7(3), p.213-218, 2003.

RASKIN, S.; PETZL-ERLER, M.L.; PHILLIPS, J.A.; PEREIRA-FERRARI, L.; PROBST, C.M.; FAUCZ, F.R.; et al. Cystic fibrosis gene variability in two southern Brazilian Amerindian populations: analysis of the deltaF508 mutation and the KM19 and XV2C haplotypes. **Hum Biol.**, v.79(1), p.79-91, 2007.

RASKIN, S.; PEREIRA-FERRARI, L.; REIS, F.C.; ABREU, F.; MAROSTICA, P.; ROZOV, T.; et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **J Cyst Fibros.**, v.7(1), p.15-22, 2008.

RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **Lancet.**, v.361(9358), p.681-689, 2003.

RATJEN, F.A. Cystic fibrosis: Pathogenesis and future treatment strategies. **Respirat Care.**, v.54, p.595-605, 2009.

REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA ANO 2014.

Relatório anual de 2014. Disponível:

<[http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2014\\_Portugues\\_site.pdf](http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2014_Portugues_site.pdf)>.

Acessado em 22 de março de 2016.

REIS, F.J.C.; CAMARGO, P.A.M.; ROCHA, S.F. Survival analysis for cystic fibrosis in Minas Gerais State, Brazil. **J Trop Pediatr.**, v.44, p.329-331, 1998.

REIS, F.J.C.; OLIVEIRA, M.C.L.; PENNA, F.J.; OLIVEIRA, M.G.R.; OLIVEIRA, E.A.; MONTEIRO, A.P.A.F. Quadro clínico e nutricional de pacientes com fibrose cística: 20 anos de seguimento no HC-UFGM. **Rev Assoc Med Brasil.**, v.46(4), p. 325-330, 2000.

REIS, F. J. C.; DAMACENO, N. Fibrose cística. **J Pediatr.**, v.74(1), p. 76-94, 1998.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. O.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista. **J Pediatr.**, v.78(2), p. 171-186, 2002.

ROGAN, M. P.; STOLTZ, D. A.; HORNICK, D. B. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. **Chest**, v.139(6), p.1480-1490, 2011.

ROSA, F.R.; DIAS, F.G.; NOBRE, L.N.; MORAIS, H. A. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. **Rev. Nutr.**, v.21(6), p. 725-737, 2008.

ROSENFELD, M.; SONTAG, M.K.; REN, C.L. Cystic Fibrosis Diagnosis and Newborn Screening. **Pediatr Clin North Am.**, v.63(4), p.599-615, 2016.

ROSENSTEIN, B.J. Nonclassic cystic fibrosis: a clinical conundrum. **Pediatr Pulmonol.**, v.36(1), p.10-12, 2003.

ROTHBERG, J.M.; HINZ, W.; REARICK, T.M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature.**, v.475(7356), p.348-352, 2011.

ROWNTREE, R.K.; HARRIS, A. The phenotypic consequences of *CFTR* mutations. **Annals of human genetics.**, v. 67, p. 471-485, 2003.

ROWE, S.M.; MILLER, S.; SORSCHER, E.J. Mechanisms of disease: Cystic Fibrosis. **N Engl J Med.**, v.352, p.1992-2001, 2005.

RUEEGG, C.S.; KUEHNI, C.E.; GALLATI, S.; BAUMGARTNER, M.; TORRESANI, T.; BARBEN, J.; SWISS, C.F.; SCREENING TASK FORCE. One-year evaluation of a neonatal screening program for cystic fibrosis in Switzerland. **Dtsch Arztebl Int.**, v.110(20), p.356-363, 2013.

SANTANA, M.A.; MATOS, E.; DO SOCORRO FONTOURA, M.; FRANCO, R.; BARRETO, D.; LEMOS, A.C. Prevalence of pathogens

cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v.7(1), p.69-72, 2003.

SANTOS, G. P. C.; DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O.; RIEDI, C. A.; ROSÁRIO, N. A. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J Pediatr.**, v.81(3), p. 240-244, 2005.

SARAIVA-PEREIRA, M. L.; FITARELLI-KIEHL, M.; SANSEVERINO, M. T. V. A genética na fibrose cística. **Rev HCPA.**, v.31(2), p.160-167, 2011.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol.**, v.26(10), p.1135-1145, 2008.

SLIEKER, M.G.; SANDERS, E.A.M.; RIJKERS, G.T.; RUVEN, H.J.T.; VAN DER ENT, C.K. Disease modifying genes in cystic fibrosis. **J Cyst Fibros.**, v.4, p. 7-13, 2005.

SLOANE, P.A.; ROWE, S.M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. **Curr Opin Pulm Med.**, v.16, p.591-97, 2010.

SONTAG, M.K.; ACCURSO, F.J. Gene modifiers in pediatrics: application to cystic fibrosis. **Adv. Pediatr.**, v.51, p. 5-36, 2004.

SOUTHERN, K.W.; MUNCK, A.; POLLITT, R.; TRAVET, G.; ZANOLLA, L.; ROELSE, J.D.; et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. **J Cystic Fibrosis.**, v.6, p.57-65, 2007.

SOUZA, C. F. M.; SCHWARTZ, I. V.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. **Cien Saud Col.**, v.7(1), p. 129-137, 2002.

SPICUZZA, L.; SCIUTO, C.; DI DIO, L.; MATTINA, T.; LEONARDI, S.; DEL GIUDICE, M.M.; et al. Mild cystic fibrosis in patients with the rare P5L CFTR mutation. **J Cyst Fibros.**, v.11(1), p.30-33, 2012.

STANKE, F.; BECKER, T.; KUMAR, V.; HEDTFELD, S.; BECKER, C.; CUPPENS, H.; et al. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic defect of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. **J Med Genet**, v. 48(1), p. 24-31, 2011.

STREIT, C.; BURLAMAQUE-NETO, A.C.; SILVA, F.A.; GIUGLIANI, R.; SARAIVA-PEREIRA, M.L. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. **Mol Gen Metab.**, v.78, p. 259-64, 2003.

STROM, C.M.; CROSSLEY, B.; BULLER-BUERKLE, A.; JARVIS, M.; QUAN, F.; PENG, M.; et al. Cystic fibrosis testing 8 years on: lessons learned from carrier screening and sequencing analysis. **Genet Med.**, v.13(2), p.166-172, 2011.

STROM, C.M.; CROSSLEY, B.; BULLER-BUERKLE, A.; JARVIS, M.; QUAN, F.; PENG, M.; et al. Cystic fibrosis testing 8 years on: lessons learned from carrier screening and sequencing analysis. **Genet Med.**, v.13(2), p.166-172, 2011.

TERLIZZI, V.; CARNOVALE, V.; CASTALDO, G.; CASTELLANI, C.; CIRILLI, N.; COLOMBO, C.; et al. Clinical expression of patients with the D1152H CFTR mutation. **J Cyst Fibros.**, v.14(4), p.447-452, 2015.

VANKEERBERGHEN, A.; CUPPENS, H.; CASSIMAN, J.J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. **J. Cyst. Fibros.**, v.1, p.13-29, 2002.

VERA, A.; HENRÍQUEZ-ROLDÁN, C.F.; GONZÁLEZ, F.J.; MOLINA, G. Screening of the delta-F508 mutation and analysis of two Single Nucleotide Polymorphism of the CFTR gene, in a sample of the general population of Valparaíso, Chile. **Rev Med Chil.**, v.133(7), p.767-775, 2005.

VINOD K. K. Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. In: **Proceedings of the training programme on Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training.** Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. India 2004. p. 109-121.

WEISS, F.U.; SIMON, P.; BOGDANOVA, N.; MAYERLE, J.; DWORNICZAK, B.; HORST, J.; et al. Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. **Gut.**, v.54(10), p.1456-1460, 2005.

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

WILL, K.; DÖRK, T.; STUHRMANN, M.; MEITINGER, T.; BERTELE-HARMS, R.; TÜMMLER, B.; et al. A novel exon in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene activated by the nonsense mutation E92X in airway epithelial cells of patients with cystic fibrosis. **J Clin Invest.**, v.93(4), p.1852-1859, 1994.

WILSCHANSKI, M.; ZIELENSKI, J.; MARKIEWICZ, D.; TSUI, L.C.; COREY, M.; LEVISON, H.; et al. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. **J Pediatr.**, v.127(5), p.705-710, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/genomics/publications/en>>. Acessado em 17 de janeiro de 2015.

ZIELENSKI, J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. **Respiration.**, v.67, p.117- 133, 2000.

ZIELENSKI, J.; TSUI, L.P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. **Annu rev. genet.**, v.29, p. 777-807, 1995.

ZVEREFF, V.V.; FARUKI, H.; EDWARDS, M.; FRIEDMAN, K.J. Cystic fibrosis carrier screening in a North American population. **Genet Med.**, v.16(7), p.539-546, 2014.

**ANEXO 1**  
**COMPROVANTES DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE**  
**PESQUISA NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM**  
**SERES HUMANOS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de um kit diagnóstico de Fibrose Cística

**Pesquisador:** FABÍOLA ROSSI MENEGOTTO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 34569814.1.0000.5361

**Instituição Proponente:** DNANALISES - UNIDADE DE NEGOCIOS LTDA - ME

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 789.932

**Data da Relatoria:** 11/09/2014

**Apresentação do Projeto:**

A fibrose Cística (FC) é uma doença genética de herança autossômica recessiva, caracterizada por manifestações crônicas e progressivas que atingem os sistemas respiratório, digestivo e reprodutor de crianças e adultos jovens, levando-os, frequentemente, à morte prematura. O diagnóstico precoce da FC tem demonstrado ser um fator determinante para um prognóstico mais favorável do paciente, possibilitando aos fibrocísticos tratamento e monitoramento pré sintomático voltados a adiar e controlar as complicações decorrentes da doença, e elevar sua expectativa de vida. A média de sobrevida dos pacientes com FC no Brasil é de apenas 18 anos, uma estimativa que equivale à observada em países desenvolvidos ainda nos anos 80. Isto indica a necessidade de adequar o sistema de diagnóstico e tratamento da doença utilizado no Brasil aos padrões empregados em países onde estas estratégias já estão bem desenvolvidas. Neste sentido, já se sabe que a utilização de estratégias baseadas na análise de diferentes mutações do gene CFTR permite aumentar a acuidade do diagnóstico, melhorando o valor preditivo dos programas de rastreio. Assim, a abordagem nacional de rastreamento da FC seria mais eficiente se, uma vez conhecido os perfis mutacionais variáveis das diferentes regiões e grupos étnicos do país, fossem realizadas análises para a identificação das mutações significativas de cada grupo populacional brasileiro. Porém, um dos grandes problemas atuais no diagnóstico genético laboratorial da FC é a

**Endereço:** Rui Barbosa, nº 152

**Bairro:** Agronômica

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9092

**Fax:** (48)3251-9092

**CEP:** 88.025-301

**E-mail:** cephijg@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 789.932

falta de um método rápido, barato e confiável para fazer isto. Sendo assim, o objetivo do presente projeto é, inicialmente, selecionar entre 43 diferentes mutações do gene CFTR de interesse clínico e epidemiológico para a população brasileira, aquelas identificadas mediante rastreo epidemiológico-molecular em recém nascidos com suspeita de FC oriundos do Estado de Santa Catarina, bem como aquelas que, segundo estudos prévios, são frequentemente observadas em outros Estados. Em seguida, propõe-se desenhar e padronizar uma metodologia, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilite a amplificação simultânea do painel das mutações de interesse anteriormente selecionadas, para, então, desenvolver um kit diagnóstico molecular para FC e validá-lo, através da sua aplicação em novas amostras de recém-nascidos com diagnóstico de FC confirmado e mediante controle externo de qualidade, à realidade regional e nacional. Com esta estratégia, se buscará que a metodologia desenvolvida reúna rapidez e simplicidade de execução, eficiência diagnóstica, e baixo custo para ser introduzida ao mercado e absorvida por programas de rastreo da doença. Acreditamos que o produto a ser desenvolvido venha facilitar o diagnóstico precoce da FC, possibilitando antecipar o tratamento dos afetados e proporcionar-lhes uma melhor qualidade de vida e prognóstico mais favorável.

**DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO:** A população de estudo será dividida dois grupos: População de estudo 1 será composta por pacientes com diagnóstico prévio de FC, oriundos de todos o Estado de Santa Catarina, monitorados pelo Centro Especializado de suor acima de 60 mEq/l, seria suficiente para confirmar o diagnóstico de Fibrose Cística. Porém, por motivos técnicos, o teste é usualmente realizado somente após o segundo mês de vida, mesmo quando há forte suspeita clínica, então, apesar da urgência do resultado, já que o tempo entre a coleta e a realização do teste é de importância vital para dar início ao tratamento dos casos diagnosticados, que deve começar antes dos primeiros 30 dias de vida, o diagnóstico do recém-nascido não pode ser confirmado. Ademais, sabe-se que um número considerável de afetados tem níveis intermediários de cloreto no suor (entre 40 e 60 mEq/l), o que também dificulta o diagnóstico, e acaba em interpretações incorretas. Sendo assim, a análise de DNA é extremamente útil para confirmação de uma hipótese diagnóstica. Portanto, para o correto diagnóstico da FC o mais adequado é constatar a presença de no mínimo uma característica clínica da doença e a presença do fator genético para confirmar o diagnóstico. Se esta sistemática fosse aplicada, seria possível diminuir o tempo de diagnóstico e melhorar o valor

Endereço: Rui Barbosa, nº 152  
Bairro: Agronômica CEP: 88.025-301  
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251-9092 E-mail: cephlj@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 789.932

preditivo

positivo dos programas de rastreio, por baixar as taxas de falso-positivos/negativos. No entanto, na triagem neonatal de FC, de acordo com as normas do MS, para a confirmação da disfunção gênica, busca-se caracterizar, entre mais de 1900 mutações do gene CFTR (Gene Regulador da Condutância Transmembrânica - o causador da FC), apenas a mutação F508, tida como a mais frequente na população mundial (66%). Para isto, o SUS paga 60 reais pelo teste. Só que neste caso, a pesquisa de apenas uma mutação do gene CFTR, ao invés de melhorar o valor preditivo positivo dos programas de rastreio, acaba tendendo a um aumento de resultados falso-negativos o que, quando ainda somados à possibilidade de superposição de sinais e sintomas de patologias comuns do nosso meio (como é o caso das diarreias crônicas, da desnutrição e das infecções pulmonares), acaba por gerar falha e/ou um atraso significativo no diagnóstico e, conseqüentemente, no seguimento e tratamento dos afetados. Este conjunto de circunstâncias reflete em piora prognóstica e diminuição da sobrevida dos fibrocísticos no Brasil. Apesar disso, é evidente que com o custo pago pelo SUS é impossível buscar mais de uma mutação para a confirmação da disfunção do gene. Frente a tais "carências" do sistema diagnóstico, em muitos Estados brasileiros a confirmação molecular, mesmo sendo necessária, nem chega ser realizada. Diante desta realidade, o DNAálises, preocupado com a situação dos portadores de FC no Brasil, autofinanciou uma pesquisa de rastreamento da FC em Santa Catarina e obteve resultados assustadores:

os dados dos nossos estudos, realizados de 2002 até 2009, com pacientes clinicamente diagnosticados para fibrose cística demonstram que apenas 27% dos afetados possuem a mutação F508, a única investigada em pacientes com suspeita de FC encaminhados para a identificação molecular da mutação genética em Santa Catarina. A baixa frequência da mutação F508 foi também

**Endereço:** Rui Barbosa, nº 152**Bairro:** Agronômica**CEP:** 88.025-301**UF:** SC**Município:** FLORIANOPOLIS**Telefone:** (48)3251-9092**Fax:** (48)3251-9092**E-mail:** cephlg@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 788.932

referenciada em outros Estados, variando entre 23% e 50% dos pacientes com FC. Portanto, no Brasil, onde diferenças étnicas refletem a heterogenicidade genética, estima-se que aproximadamente 70% dos alelos mutantes de FC, uma doença tão complexa, permanecem não caracterizados, indicando que outras mutações devam estar envolvidas. Estes dados apontam a necessidade óbvia de um processo diagnóstico estruturado, onde uma triagem molecular mais detalhada incluindo mutações além da F508 seja desenvolvida para apoiar ou excluir o diagnóstico. Essa medida pode fazer a diferença entre viver em média 10-18 anos, que é o que acontece com as crianças brasileiras, ou 40 anos, no caso de uma criança portadora norte-americana, por exemplo. Por outro lado, neste contexto é importante ainda salientar que tanto no Brasil como na maioria dos países em desenvolvimento, é comum utilizar padrões diagnósticos e de tratamento desenvolvidos em países onde a FC já é bem caracterizada. Nestes países desenvolvidos é comum a utilização de kits diagnósticos desenvolvidos a partir das mutações frequentes nos países de origem, como por exemplo os Kits da Elucigene, que detectam simultaneamente até 50 mutações frequentes da Europa. No entanto, estes kits existentes no mercado internacional, além de limitados aos de maior poder aquisitivo, devido ao elevado custo destes insumos, considerados extremadamente caros para o padrão público nacional, acabam por acarretar também problemas de público alvo, já que as mutações causadoras da doença em países desenvolvidos não são as mesmas encontradas no Brasil devido às diferenças étnicas das populações. Sendo assim, por exemplo, o mesmo teste genético que é aplicado para crianças norte-americanas pode não ser eficiente para as crianças brasileiras. Mais do que isso, existem diferenças nos erros genéticos mesmo entre nascidos nos diferentes Estados do Brasil, entre descendentes de europeus e africanos. Frente ao exposto, fica evidente a necessidade de rastrear os defeitos genéticos em pacientes brasileiros e, a partir daí, desenvolver um teste diagnóstico de FC particularizado ao Brasil.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônoma

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

Continuação do Parecer: 789.932

Ademais se deve

levar em conta o custo/benefício do método, considerando-se fatores como rapidez, simplicidade, eficiência e baixo custo ao se planejar o rastreamento neonatal. Sendo assim, nossos esforços destinar-se-ão a desenvolver um kit diagnóstico laboratorial para FC, desenhado para permitir a identificação simultânea de diferentes mutações do gene CFTR, específicas para a população de Santa Catarina e, a medida do possível, significativas para outras regiões do País, além de ser acessível financeiramente à realidade brasileira. É importante salientar que a equipe do projeto já atua no diagnóstico molecular da FC em Santa Catarina, vivenciando a grande necessidade de adequar o sistema diagnóstico do Estado em prol das crianças afetadas. Propomos, então, ampliar o sistema de diagnóstico incluindo novos marcadores moleculares, a ser selecionados entre um grupo de 43 mutações comuns em todas as raças e associadas a uma maior gravidade da doença em função da frequência de identificação destas na população do Estado de Santa Catarina aqui determinadas, bem como da frequência de identificação em outros estudos brasileiros prévios. Nosso intuito é, portanto, determinar um padrão de mutações que represente a realidade Estadual e, se possível alcançar um nível adequado de abrangência nacional, para que o produto a ser desenvolvido possa ser aplicado aos programas de triagem. Com esta iniciativa espera-se antecipar e aumentar o número de diagnóstico de recém-nascidos afetados negativos para a mutação F508, não caracterizados atualmente. Acreditamos que como consequência disto, será possível tratar antecipadamente estes pacientes, e assim, melhorar significativamente sua qualidade de vida e aumentar sua sobrevida.

Resumidamente, entre as externalidades que pretendemos alcançar com o projeto, podemos citar:

Antecipar o diagnóstico da FC, reduzindo a defasagem entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico definitivo; • Aumentar a taxa de diagnóstico; • Facilitar enormemente o tratamento dos

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agronômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephiig@saude.sc.gov.br

HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 789.932

portadores

da fibrose cística; • Possibilitar êxito na amenização dos sintomas decorrentes da fibrose cística; • Diminuir a possibilidade de internações recorrentes; • Economia no tratamento ao longo dos anos, que se torna mais efetivo e específico; • Produto nacional que proporcionará barateamento dos exames de diagnóstico molecular da FC; • Aumentar investigação de portadores e possibilitar o aconselhamento genético aos casais e familiares em relação a futuras gestações; • Grande impacto social para a população no aumento da sobrevida dos pacientes. Fibrose Cística do Hospital Infantil Joana de Gusmão em Florianópolis – SC (HIJG) e referidos por apresentar todas ou algumas das características clínicas da doença: mucoviscosidade, síndrome de má absorção, desnutrição proteica e pneumonias bacterianas. Estes indivíduos terão seu sangue coletado em papel filtro para análise molecular destinada ao rastreo epidemiológico de 43 mutações do

gene CFTR. Em geral sabe-se que os pacientes que compõe a população de estudo são provenientes de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina e possuem diferentes origens étnicas, entre eles descendentes de portugueses, alemães, italianos, e outras origens. Antes da coleta de sangue para a participação na pesquisa, acontecerá uma conversa com o paciente ou seu responsável legal a fim de explicar o projeto e convidá-lo a participar. Sendo então solicitada a confirmação da participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1). A inclusão do paciente no projeto somente será aceita posteriormente a sua assinatura (ou de seu pelo responsável legal) no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. População de estudo 2 será composta por recém-nascidos oriundos de

Endereço: Rul Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 789.932

todo o Estado de Santa Catarina, que apresentarem valores acima do limiar na segunda dosagem da tripsina imunorreativa (TIR-2) do "Teste do Pezinho" do Programa Nacional de Triagem Neonatal, a ser realizado no LACEN/SC durante o transcurso do presente projeto (a começar pelo primeiro mês deste) e de novos pacientes avaliados pelo Grupo Especializado de Fibrose Cística do HIJG, durante o mesmo período, que apresentarem as características clínicas típicas da doença. A seleção dos participantes ocorrerá no LACEN/SC e HIJG. No LACEN, antes da coleta para a segunda dosagem da TIR do "teste do pezinho", acontecerá uma conversa com os responsáveis pelo recém-nascido a fim de explicar o projeto e convidá-los a participar, sendo então solicitada a confirmação da participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O mesmo ocorrerá antes da coleta dos pacientes acompanhados pelo Grupo Especializado de Fibrose Cística do HIJG. A inclusão do paciente no projeto somente será aceita posteriormente a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo responsável legal.

**AMOSTRA:** A extração de DNA será realizada a partir de amostra de sangue seco em papel filtro coletada a partir de uma picada no dedo do paciente com diagnóstico prévio de FC ou com a mesma amostra de sangue do RN coletada em papel filtro para o "teste do pezinho". Portanto, o último caso apresenta a vantagem de não necessitar nova coleta. As amostras de sangue seco em papel filtro serão encaminhadas para o Laboratório DNAnálises, seguindo as normativas de transporte de amostra biológica estipuladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), para a extração do DNA genômico e, posteriormente, realização das provas moleculares propostas no projeto: Extração do DNA; Caracterização epidemiológico-molecular e provas para a Validação e certificação da qualidade do Kit Diagnóstico para Fibrose Cística a ser desenvolvido.

**ANÁLISE DOS DADOS:** O nível de significância adotado será de 5%. Para a análise serão utilizados os Programas estatísticos SPSS 17.0 (SPSS, Chicago), usando para a construção dos

**Endereço:** Rui Barbosa, nº 152**Bairro:** Agrônoma**CEP:** 88.025-301**UF:** SC**Município:** FLORIANOPOLIS**Telefone:** (48)3251-9092**Fax:** (48)3251-9092**E-mail:** cephiig@saude.sc.gov.br

Continuação do Parecer: 789.932

gráficos o

software GraphPad Prisma 5, Adobe Photoshop 6.0 e Adobe Illustrator CS3.

ASPECTOS ÉTICOS: O protocolo do presente estudo será submetido ao CONEP que designará o CEP responsável por acompanhar o projeto. Ainda, a amostra somente será incluída após autorização mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que deverá ser assinado pelo paciente ou seu representante legal.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### \*OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar um kit Diagnóstico Laboratorial de Fibrose Cística para a detecção *in vitro* qualitativa e simultânea de mutações características do perfil mutacional do gene do regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) típicas da população de Santa Catarina, bem como das mutações mais prevalentes em outras regiões do Brasil.

##### \* OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a presença de um grupo de 43 mutações do gene CFTR, comuns de todas as raças e identificadas em outros estudos nacionais, em amostras de recém-nascidos oriundos de todo o Estado de Santa Catarina que apresentam suspeita clínica de FC;

Estabelecer a frequência das mutações rastreadas na população de Santa Catarina e comparar com frequências encontradas em outros trabalhos realizados no Brasil;

Construir um painel de detecção das mutações comuns identificadas no Estado de Santa Catarina e outras regiões do Brasil;

Otimizar uma metodologia de detecção simultânea de mutações no gene CFTR utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para que reúna sensibilidade e especificidade, simplicidade de execução, rapidez diagnóstica, e baixo custo ao mercado nacional;

Produzir um lote pioneiro de Kits Diagnósticos Laboratorial de Fibrose Cística utilizando PCR e aplicá-lo em pacientes com Diagnóstico Clínico de FC para validação interna da técnica e certificação da garantia dos processos pelo órgão certificador externo PNCQ (Programa Nacional de Controle de Qualidade)

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Um possível risco que seu consentimento poderia ter é a do uso indevido da amostra, porém é um

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônoma

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 789.932

compromisso do pesquisador com você que este risco não existirá, pois a amostra será utilizada única e exclusivamente para a avaliação molecular da presença de diferentes mutações do gene CFTR, ou seja, não será armazenada para outros estudos. Assumimos o compromisso garantindo assistência, acompanhamento e indenização por qualquer dano decorrente da pesquisa, conforme previsto na lei (V.6 e V.7 da Resolução CNS 466/2012.)

**Benefícios:**

No Brasil a expectativa de vida dos fibrocísticos ainda é baixa em comparação com outros países, onde mais da metade dos pacientes brasileiros continuam morrendo antes de completarem os 10 anos de idade. Isto demonstra a existência de falhas no sistema empregado para o diagnóstico e tratamento da doença no país, e ratifica a necessidade de adequar os programas de triagem neonatal à realidade nacional, no intuito de aumentar o número de casos diagnosticados precocemente. O método tradicional de rastreamento neonatal preconizado pelo Ministério da Saúde, combina a triagem prévia pela dosagem de TIR, a análise molecular da mutação F508, e análise pelo teste de suor. Esse sistema, ao parecer ainda falho, poderia ser muito mais eficiente se fossem realizadas análises adicionais que permitam a detecção de outras mutações do gene CFTR, além da F508. Tal abordagem já é utilizada em países desenvolvidos através de kits diagnósticos desenhados para identificar as mutações frequentes e importantes para população de seus países. A necessidade de ampliar a abordagem de rastreio neonatal empregada no Brasil é consequência da baixa frequência da mutação F508, observada entre pacientes fibrocísticos no país, que ronda apenas 30% dos casos, permanecendo, por tanto, aproximadamente 70% dos alelos mutantes FC não caracterizados. Por outro lado, se levarmos em conta que as mutações do gene CFTR são variáveis entre diferentes regiões geográficas e distintos grupos étnicos, e que no Brasil, embora prevaleça a contribuição de Portugueses, a população é etnicamente homogênea, faz-se necessária a análise do maior número de mutações disponíveis e levando-se em conta o perfil mutacional de cada população. Portanto, mais estudos são necessários para melhor caracterizarmos nossa população em relação às frequências das mutações no gene CFTR. Neste contexto, é importante salientar também que outro grande problema atual no diagnóstico genético laboratorial da FC é a falta de um método rápido, barato e confiável para fazer isto. Assim, frente à inexistência de um produto de produção nacional, há dependência de realizar análises moleculares muito dispendiosos e/ou importação de kits existentes no mercado internacional que, além de que pode não ser eficiente para as crianças brasileiras, também tornasse muito caros para o padrão nacional, e portanto, em ambos casos, limitados aos de maior poder aquisitivo.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saudefsc.gov.br

## HOSPITAL INFANTIL JOANA DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 789.932

Assim sendo, se atuais carências no sistema de diagnóstico laboratorial para FC utilizado na rotina fossem adequadas à realidade nacional, a quantidade de pacientes com diagnóstico confirmados ou excluídos poderia aumentar através da identificação molecular das mutações do gene CFTR, o que favoreceria o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, repercutiria em antecipação do tratamento, aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida do fibrocístico no Brasil. Acreditamos que o desenvolvimento do kit diagnóstico laboratorial de FC proposto neste projeto, desenhado a partir da seleção de mutações frequentes na população de Santa Catarina e outros Estados do Brasil, e padronizado para ser um método rápido e barato, por utilizar a metodologia de PCR para amplificação simultânea do painel de mutações de interesse, seguindo um mesmo protocolo de termociclagem, possa adequar-se aos programas de triagem da FC e contribuir a favor do fibrocístico no Brasil.

Sendo assim citamos como possíveis benefícios: Antecipar o diagnóstico da FC, reduzindo a defasagem entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico definitivo; Aumentar a taxa de diagnóstico; Facilitar enormemente o tratamento dos portadores da fibrose cística; Possibilitar êxito na amenização dos sintomas decorrentes da fibrose cística; Diminuir a possibilidade de internações recorrentes; Economia no tratamento ao longo dos anos; Produto nacional que proporcionará barateamento dos exames de diagnóstico molecular da FC; Grande impacto social para a população no aumento da sobrevida dos pacientes.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto muito bem escrito e explicado, com relevância clínica e social, devendo apenas fazer as adequações sugeridas no box Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Acredita-se que o desenvolvimento do kit diagnóstico laboratorial de FC proposto neste projeto, desenhado

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônoma

CEP: 88.025-301

UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 789.932

a partir da seleção de mutações frequentes na população de Santa Catarina e outros Estados do Brasil, e padronizado para ser um método rápido e barato, por utilizar a metodologia de PCR para amplificação simultânea do painel de mutações de interesse, seguindo um mesmo protocolo de termociclagem, possa adequar-se aos programas de triagem da FC e contribuir a favor do fibrocístico no Brasil - o que torna extremamente relevante o desenvolvimento da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram entregues.

**Recomendações:**

Nada a recomendar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências elencadas no Parecer Consubstanciado deste CEP, número 758.591 foram adequadamente respondidas

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme preconizado na Resolução 466/2012, XI.2, item d, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final.

Assim sendo, o(a) pesquisador(a) deve enviar relatórios parciais semestrais da pesquisa ao CEP (a partir de março/2015) e relatório final quando do seu encerramento.

Um modelo deste relatório está disponibilizado no site <http://www.saude.sc.gov.br/hijg/cep/deveresdopesquisador.htm>

**Endereço:** Rui Barbosa, nº 152**Bairro:** Agronômica**CEP:** 88.025-301**UF:** SC**Município:** FLORIANOPOLIS**Telefone:** (48)3251-9092**Fax:** (48)3251-9092**E-mail:** cephijg@saude.sc.gov.br

**HOSPITAL INFANTIL JOANA  
DE GUSMÃO/ SES -SC**

Continuação do Parecer: 789.932

FLORIANOPOLIS, 12 de Setembro de 2014

Assinado por:  
**Jucélia Maria Guedert**  
(Coordenador)

Endereço: Rul Barbosa, nº 152  
Bairro: Agronômica CEP: 88.025-301  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251-9092 E-mail: cephij@saude.sc.gov.br

## ANEXO 2

## ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA



## Jacobs Journal of Pediatrics

Research Article

## Prevalence of F508del Mutation and Evaluation of Molecular Screening for Cystic Fibrosis in Brazil

Sabrina Gonçalves MS<sup>1\*</sup>, Fabiola Rossi Menegotto PhD<sup>2</sup>, Louise Lapage de Camargo Pinto MD, PhD<sup>3</sup>, Norberto Ludwig Neto MD<sup>4</sup>, Maria Elizabeth Menezes PhD<sup>4</sup>, Celso Spada PhD<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>2</sup>Diagnoses Laboratory, Florianópolis, Brazil

<sup>3</sup>Children's Hospital Joana de Gusmão, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>4</sup>Central Laboratory of Public Health, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

\*Corresponding author: Dr. Sabrina Gonçalves, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Campus Universitário - Trindade, Florianópolis - SC, Brazil. Zip code: 88010-970, Tel: +55 (48) 3721 9712;

Fax: +55 (48) 3721 9542; E-mail: sabrina\_197@hotmail.com

Received: 08-26-2016

Accepted: 03-12-2017

Published: 04-04-2017

Copyright: © 2017 Sabrina Gonçalves

## Abstract

**Introduction:** Cystic fibrosis (CF) is considered the most common lethal inherited disease among children and young people of Caucasian origin and it is a consequence of mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (*CFTR*). As established by the Brazilian Health Ministry Unified Health System, people who have a positive immunoreactive trypsin (IRT) result test and a positive sweat test are referred for molecular investigation of the F508del mutation in the *CFTR* gene.

**Objective:** To verify the frequency of the F508del mutation in the state of Santa Catarina, Brazil, and to identify the requirement for a broader molecular screening to confirm or exclude the diagnosis of cystic fibrosis.

**Methods:** Descriptive, retrospective, cross-sectional study of patients followed at the center of excellence for the treatment of the cystic fibrosis in the state of Santa Catarina between 2002 and 2015.

**Results:** Ninety-four patients with mean age of  $7.62 \pm 4.08$  years were studied; 55.32% of whom male and 94.68% Caucasian. Of the 188 alleles analyzed, a frequency of 92 (48.94%) alleles was observed for the F508del mutation and 96 (51.06%) for other mutations. The genotype frequencies found for F508del/F508del, F508del/another mutation, and another mutation/another mutation genotypes were, respectively: 28.72% (27 patients), 40.43% (38 patients), and 30.85% (29 patients). Hardy-Weinberg equilibrium was calculated and yielded a chi-square value = 3.43 ( $p = 0.06$ ). The study population was in equilibrium.

**Conclusions:** According to the guidelines of the Brazilian neonatal screening program, the molecular diagnosis be only be confirmed with the presence of two disease-causing mutations in the *CFTR* gene, one in each allele. In our study, we observed that only 28.72% of patients had a confirmed molecular diagnosis, which allows us to infer that the molecular diagnosis strategy for cystic fibrosis must be restructured in Brazil to provide a diagnostic contribution to the sweat test.

**Keywords:** Cystic Fibrosis; Genotype; Mutation; Prevalence

### ANEXO 3

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você (ou o menor pelo qual você é responsável) está sendo convidado (a), para participar da Pesquisa intitulada “Desenvolvimento De Um Kit Diagnóstico de Fibrose Cística baseado em um Painel Molecular para Detecção Simultânea de Múltiplas Mutações do Gene CFTR” sob a responsabilidade da Dra. Maria Elizabeth Menezes, a qual pretende desenvolver e padronizar uma metodologia para a identificação simultânea de diferentes mutações do gene CFTR da Fibrose Cística (FC). O motivo que nos leva a estudar esta questão é a necessidade de buscar alternativas que venham a facilitar o diagnóstico rápido da doença para que, a partir do seu conhecimento, possa ser antecipada uma série de procedimentos de tratamento e acompanhamento adequados, visando proporcionar aos afetados uma melhor qualidade de vida. A participação neste projeto não tem objetivo de submeter o menor a um tratamento, bem como não causará nenhum gasto com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de você aceitar que, após a coleta de sangue, uma pequena parte da amostra do sangue seja submetida à realização deste estudo. Cabe destacar que, no caso desta coleta estar sendo realizada para o “teste do pezinho”, a utilização desta pequena parte da amostra não interferirá de nenhuma forma na análise e no resultado do teste.

Desta forma, o único possível risco que sua participação poderia ter é a de usarmos a amostra para outra finalidade, porém é um compromisso do pesquisador com você que este risco não existirá, pois a amostra será utilizada única e exclusivamente para a avaliação molecular da presença de diferentes mutações do gene CFTR, ou seja, não será armazenada para outros estudos. Assumimos o compromisso garantindo assistência, acompanhamento e indenização por qualquer dano decorrente da pesquisa, conforme previsto na lei (V.6 e V.7 da Resolução CNS 466/2012.).

Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós. Se você aceitar participar, estará contribuindo com uma pesquisa científica que através da avaliação dos resultados poderá futuramente favorecer também outros pacientes. Assim mesmo, a participação na pesquisa possibilita realizar, sem custo adicional, uma análise genética para mutação do gene causador da Fibrose Cística, uma metodologia mais detalhada e normalmente bastante cara, que poderá servir de apoio à exclusão ou confirmação do diagnóstico. Você também poderá contar com um resultado do exame, fornecido após a pesquisa, que será encaminhado às clínicas de origem para que os médicos deem o retorno aos participantes.

O desenvolvimento da pesquisa se dará no laboratório de Genética e Biologia Molecular DNAnálises em Florianópolis - SC.

Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Há total liberdade para recusar-se a participar, retirar o consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e não aceitar participar não irá ocasionar qualquer punição ou perda de benefícios.

Sua identidade (e/ou a do menor) será preservada, e não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Esta pesquisa garantirá o sigilo de seu nome, pois será atribuído um número para cada amostra, assim os resultados serão devolvidos para a equipe médica da mesma forma. Uma via deste consentimento informado será arquivada no Laboratório DNAnálises e outra será fornecida a você.

A participação não gerará nenhuma despesa e também não acarretará em nenhum ganho financeiro.

Para qualquer outra informação, pode-se entrar em contato com o pesquisador pelo telefone (48) 32248128 ou e-mail: [dnanalise@dnanalise.com.br](mailto:dnanalise@dnanalise.com.br).

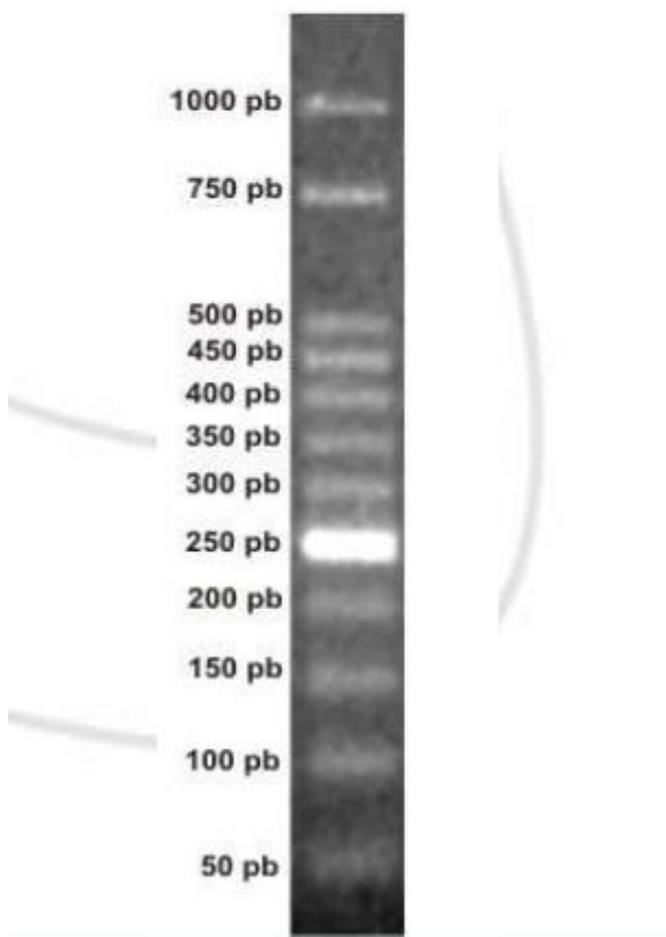
Igualmente, este estudo será acompanhado por um Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP), composto por um grupo de pessoas que estarão trabalhando para garantir que seus direitos sejam respeitados. Desta forma, se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou, ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato a qualquer momento com o CEP do Hospital Infantil Joana de Gusmão pelo telefone 48 – 32519092 ou pelo email: [cephijg@saude.sc.gov.br](mailto:cephijg@saude.sc.gov.br). Você pode inclusive fazer a reclamação sem se identificar, se preferir.

Eu, \_\_\_\_\_, na condição participante ou de responsável pelo menor \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do participante (ou responsável)

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

**ANEXO 4**  
**MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50 PB (LUDWIG BIOTEC®)**



## ANEXO 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO RETROSPECTIVO E RESULTADOS



## ANEXO 6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO PROSPECTIVO E RESULTADOS

