Luisa Mesquita Nunes

**ESTUDO GENÉTICO CLÍNICO DE PACIENTES COM FIBROSE
CÍSTICA**

Dissertação apresentada à Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2016

Luisa Mesquita Nunes

**ESTUDO GENÉTICO CLÍNICO DE PACIENTES COM FIBROSE
CÍSTICA**

Dissertação apresentada à Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho

São Paulo

2016

N972e

Nunes, Luisa Mesquita

Estudo genético clínico de pacientes com fibrose cística /

Luisa Mesquita Nunes. -- São Paulo, 2016.

x, 38 f., il.

Dissertação (Mestrado) – Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *A clinical and genetic study of cystic fibrosis.*

1. Fibrose cística/genética. 2. Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística. 3. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

NLM - WI 820

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

SOCIEDADE BENEFICENTE ISRAELITA BRASILEIRA ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Luisa Mesquita Nunes

ESTUDO GENÉTICO CLÍNICO DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Presidente da banca: Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Anna Carla Renata Krepel Goldberg

Dra. Fabíola Villac Adde

Membros suplentes:

Dra. Luciana Cavalheiro Marti

Dra. Marina Buarque de Almeida

Aprovada em: 16/12/2016.

Agradecimentos

Ao Dr. Luiz Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho, pela orientação e apoio.

À equipe do Laboratório do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela coleta e armazenamento das amostras.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento de Nova Geração do Hospital Israelita Albert Einstein, pela realização dos exames de MLPA e Sanger.

À equipe do Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda a ajuda durante o período de coleta das amostras.

À Dra. Ester Sabino, do Instituto de Medicina Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela disponibilização do laboratório para realização do sequenciamento.

A Vivian D. T. Niewiandonski, do Laboratório Diagnósticos da América S.A., e Roberto Ribeiro, do Instituto de Medicina Tropical, pela realização da extração de DNA, preparo das bibliotecas e reação de sequenciamento.

A Dra. Debora Bertola e Dr. Guilherme Yamamoto, do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda durante a análise dos dados brutos.

Agradecimentos especiais

Ao laboratório Diagnósticos da América S.A.,
pela parceria e financiamento.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Agradecimentos especiais.....	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Resumo	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O gene CFTR	1
1.2 A proteína CFTR	2
1.3 Mutações do CFTR	4
1.4 Polimorfismos do gene CFTR.....	5
1.5 Relação genótipo-fenótipo em fibrose cística	6
1.6 Doenças relacionadas ao CFTR.....	8
1.7 Distribuição alélica.....	8
1.8 Panorama brasileiro	10
1.9 Justificativa	12
1.10 Hipótese	12
1.11 Objetivos.....	12
2 MÉTODOS	13
2.1 Pacientes.....	13
2.2 Coletas	13
2.3 Extração do DNA e reação de sequenciamento.....	13
2.4 Análise bioinformática.....	14
2.5 Classificação das variantes	15
2.6 Disponibilização dos resultados	16
2.7 Análise estatística.....	16
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES	33
6 REFERÊNCIAS	34
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de figuras

Figura 1. Modelo da estrutura da proteína CFTR	3
Figura 2. Abertura do CFTR	4
Figura 3. Classificação das mutações encontradas nos pacientes com fibrose cística	20
Figura 4. Distribuição alélica nos pacientes com fibrose cística	20

Lista de tabelas

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais dos pacientes com fibrose cística	17
Tabela 2. Medicamentos de uso crônico pelos pacientes com fibrose cística	17
Tabela 3. Colonização crônica das vias aéreas dos pacientes com fibrose cística	18
Tabela 4. Frequência dos alelos encontrados em todos os pacientes incluídos no estudo.....	18
Tabela 5. Mutações novas	21
Tabela 6. Classificação das mutações em relação à gravidade.....	22
Tabela 7. Relação entre genótipo prévio e pós-sequenciamento	23
Tabela 8. Variáveis categóricas estudadas por grupos de genótipo	24
Tabela 9. Variáveis numéricas estudadas por grupos de genótipo.....	25
Tabela 10. Associação entre características clínicas e <i>status</i> pancreático.....	25
Tabela 11. Associação entre características clínicas e íleo meconial	26

Resumo

Objetivos: Avaliar a sequência completa da região codificadora do gene CFTR de pacientes com fibrose cística ou com suspeita de fibrose cística atípica ou doenças relacionadas ao CFTR e avaliar a associação entre as mutações encontradas e parâmetros clínicos. **Métodos:** O DNA de pacientes com fibrose cística, suspeita de fibrose cística atípica ou doenças relacionadas ao CFTR foi extraído de amostras de sangue periférico, quantificado e purificado. As regiões alvo do gene CFTR foram amplificadas usando o Ion AmpliSeq™ CFTR Panel (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As bibliotecas foram preparadas com o kit Ion AmpliSeq™ HiFi mix (Life Technologies) e o sequenciamento foi realizado no equipamento IonTorrent PGM platform (Life Technologies). **Resultados:** Cento e vinte e seis pacientes com fibrose cística e 15 com suspeita de fibrose cística atípica ou doenças relacionadas ao CFTR foram incluídos no estudo. Entre os pacientes não portadores de fibrose cística identificamos um paciente com uma mutação patogênica e outra com relevância clínica desconhecida, um paciente com uma mutação de relevância clínica variável em heterozigose e um paciente com uma mutação patogênica em heterozigose. Entre os pacientes com fibrose cística, identificamos 2 mutações patogênicas em 122, uma mutação em heterozigose em 1 e nenhuma mutação patogênica em 3 pacientes. As mutações mais frequentes foram c.1521_1523delCTT (F508del), c.1624G>T (G542X) e c.2988+1G>A (3120+1G->A), respectivamente. **Conclusões:** Nosso estudo permitiu identificar mutações do CFTR na maioria dos alelos de pacientes com fibrose cística e mostrou diferenças significativas entre a prevalência de mutações do CFTR em nossos pacientes e populações norte-americanas e europeias, com prevalência menor da mutação F508del e maior das mutações G542X e 3120+1G>A. Observamos também diferença na frequência desta última em relação ao Registro Brasileiro de Fibrose Cística, provavelmente devido aos métodos diagnósticos utilizados.

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética monogênica, de herança autossômica recessiva,⁽¹⁾ caracterizada por altas concentrações de cloro no suor, anormalidades no transporte epitelial dos íons cloreto e bicarbonato, insuficiência pancreática e bronquiectasias.⁽²⁾ É a doença genética letal mais comum na população caucasiana,⁽³⁾ afetando aproximadamente 1 em cada 3.500 nascidos vivos, com grande variação de acordo com a etnia e localização geográfica.⁽³⁻⁵⁾

Apesar de existirem descrições de crianças com fibrose cística em músicas e folclore desde o século 19,^(5,6) a doença foi descrita pela primeira vez na década de 1930 por Dorothy Andersen, quando esta publicou uma série de pacientes com “fibrose cística do pâncreas”, crianças que apresentavam alterações pancreáticas, doença respiratória e complicações intestinais.⁽⁷⁾ Nos anos 40 Lowe et al.⁽⁸⁾ postularam que a doença tinha herança autossômica recessiva e, na década seguinte, Di Sant’Agnese et al.⁽⁹⁾ identificaram o aumento da perda de sal pelo suor nos pacientes com FC.

O gene responsável pela fibrose cística é o CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) e foi identificado em 1989,^(10,11) no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2). O gene contém aproximadamente 250 quilobases (kb) e 27 exons que codificam 1.480 aminoácidos.^(5,6,10,11)

1.1 O gene CFTR

No núcleo celular o gene CFTR é transcrito em um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) com 6.129 bases.^(2,5) É principalmente no retículo endoplasmático que ocorre o processo de tradução do RNAm envolvendo o ribossomo e o RNA transportador (RNAt), resultando inicialmente em um polipeptídeo nascente.⁽²⁾

O enovelamento cotraducional do CFTR é um processo complexo, lento e ineficiente, em que o polipeptídeo nascente é simultaneamente enovelado e inserido na camada bilípídica do retículo endoplasmático, processo assistido pela calnexina, calreticulina e outras proteínas auxiliaadoras. Neste processo, 55 a 80% da proteína nativa do CFTR tem algum erro de enovelamento.^(2,12) Quando ocorre um erro

na estrutura da proteína CFTR ela é alvo de um sistema de controle de qualidade chamado ERAD (degradação associada ao retículo endoplasmático), que age pelo sistema ubiquitina proteasoma (UPS) em dois *check-points*: na membrana do RE e no citoplasma.^(2,12)

A proteína CFTR imatura enovelada e inserida na membrana do RE é transportada para o Complexo de Golgi por vesículas revestidas por COPII (*coat protein complex II*). Este transporte pós-tradução é coordenado pelas proteínas auxiliaadoras Hsp70, Hsc70, Hsp90 e Hdj-2.^(2,13) No complexo de Golgi ocorre o processamento final da proteína, quando dois glicanos ligados à asparagina no quarto arco celular, no domínio transmembrana 2 (MSD2 - Figura 1), são convertidos de suas formas imaturas ricas em manose para oligossacarídeos complexos maduros.^(2,12)

Do complexo de Golgi, vesículas revestidas por clatrina transportam a proteína madura para a membrana apical, onde a CFTR apresenta uma taxa de *turn-over* de 10% por minuto e meia vida de 12 a 24 horas. As proteínas senescentes ou com função alterada são reconhecidas pela Hsp70, sofrem ubiquitinação e são internalizadas por endosomas, sofrendo então reciclagem ou degradação.^(2,14)

1.2 A proteína CFTR

O produto do gene é a proteína CFTR, parte da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e a única proteína desta família que é um canal iônico, funcionando como um canal epitelial de cloro. Outra particularidade desta proteína é a presença de um domínio regulador (R), responsável pela abertura do canal iônico quando fosforilado pela proteinoquinase A (PKA).^(2,6,14,15)

A proteína CFTR, presente nas membranas apicais das células epiteliais, é composta por 5 domínios: dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBD1 e NBD2 - *nucleotide-binding domains*), dois domínios transmembrana (MSD1 e MSD2 - *membrane spanning domains*) e um domínio R. Cada MSD contém 6 segmentos transmembrana, formando o canal pelo qual os íons cloreto passam (Figura 1).^(2,6,12)

Fonte: Adaptado de Gadsby DC, Vergani P, CsanadyL. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440(7083):477-83.⁽¹⁵⁾

Figura 2. Abertura do CFTR

Além de sua função principal como canal de cloro, o CFTR também atua no transporte de outros ânions, como gluconato e bicarbonato, e como um regulador de outros canais iônicos. A atividade do CFTR inibe o transporte de sódio pelo canal epitelial de sódio (ENaC), regula o canal de cloreto ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*), e controla também os canais de potássio da medula renal externa (ROMK – *renal outer medular K⁺*), o CaCC (*Ca²⁺ activated chloride conductance*), o trocador sódio/próton NHE3 e uma aquaporina.^(3,6,16)

1.3 Mutações do CFTR

Atualmente existem mais de 2.000 mutações identificadas no gene CFTR e registradas no banco de dados *Cystic Fibrosis Mutation Database*,⁽¹⁷⁾ que podem ser divididas em 4 grupos: 1) mutações que causam FC, 2) mutações que causam uma doença associada ao CFTR, 3) mutações com relevância clínica desconhecida e 4) mutações com relevância clínica não provada ou incerta.⁽¹⁸⁾ Os tipos de mutações mais comuns são: *missense* (39,63%), *frameshift* (15,60%), *splicing* (11,37%) e *nonsense* (8,33%).^(5,17) As mutações do CFTR são classificadas em seis classes distintas baseadas na maneira em que elas alteram a síntese protéica.⁽⁵⁾

Nas mutações classe I a síntese de proteína está prejudicada, resultando na ausência da proteína (exemplo: c.1624G>T [G542X]) ou em uma proteína truncada não funcional (exemplo: c.3484C>T [R1162X]). São resultado de mutações *nonsense*, em que há um códon finalizador prematuro, deleções e inserções *frameshift* ou mutações em sítio de *splicing*. Esse tipo de mutação leva à perda completa ou quase completa da função da proteína CFTR.^(5,19,20)

As mutações classe II afetam o processamento da proteína no RE e complexo de Golgi, levando à síntese de uma proteína imatura, que é quase completamente degradada pela via da ubiquitina-proteasoma, de modo que pouca ou nenhuma proteína é encontrada na membrana apical. É nesta classe que está a mutação mais frequente do CFTR: c.1521_1523delCTT (F508del), em que há a deleção de 3 pares de base que codificam uma fenilalanina no exon 10, na posição 508 da proteína.^(5,6)

As mutações classe III causam regulação defeituosa da proteína por alterações nos domínios NBD1 e NBD2 que impedem a ativação do canal pelo AMPc ou ATP. A mutação c.1652G>A (G551D), por exemplo, afeta a interação com o ATP, criando uma forma de CFTR que é corretamente processada e inserida na membrana, porém não pode ser ativada.^(5,19)

Nas mutações classe IV, como c.1040G>C (R347P), c.350G>A (R117H) e c.1000C>T (R334W), o CFTR é sintetizado e está presente na membrana, mas a condutância do cloreto é diminuída. Nessa classe há função residual da proteína na membrana, podendo resultar num fenótipo menos grave ou FC atípica.^(6,19)

As mutações classe V são caracterizadas por síntese ou processamento do CFTR parcialmente prejudicado, havendo então síntese de CFTR funcionante, porém em quantidade reduzida, também podendo resultar em fenótipo menos grave ou FC atípica. As mutações mais comuns desta classe são por defeitos de *splicing* (exemplo: c.3717+12191C>T [3849+10kbC->T]).^(5,6)

As mutações classe VI (ex.: c.1679+1.6kbA>G [1811+1.6kbA->G]) são as mutações em que há a presença de CFTR funcional, mas instável na membrana apical. Geralmente resultado de mutações *nonsense* ou *frameshift*, a proteína produzida é degradada 5 a 6 vezes mais rapidamente do que a proteína selvagem.⁽⁵⁾

1.4 Polimorfismos do gene CFTR

Polimorfismo é uma alteração na sequência DNA com frequência de pelo menos 1% na população geral. Em FC, sabe-se que polimorfismos, tanto no gene CFTR quanto em genes modificadores, podem influenciar a gravidade da doença.⁽¹⁸⁾

No CFTR, uma variação no comprimento de uma sequência de politimidina (poliT) no intron 8 está relacionada a erros no *splicing* do exon 9, que codifica parte do NBD1, e a presença ou ausência deste no RNAm. Esta sequência pode ter cinco, sete ou nove timinas (alelos 5T, 7T e 9T), e, quanto mais curta, menor a eficiência do sítio receptor de *splicing* do intron 8, maior a quantidade de RNAm com deleção do exon 9 e, conseqüentemente, menor a quantidade de proteína CFTR funcional.⁽²¹⁻²⁴⁾ Quando há homozigose para o alelo 5T (genótipo 5T/5T) apenas 8-12% do RNAm do CFTR é normal.⁽²¹⁾

Por causa da penetrância incompleta da sequência poliT, quando o alelo 5T está em trans com uma mutação causadora de FC os fenótipos são muito variáveis, a pessoa afetada pode ter FC atípica, infertilidade por agenesia bilateral congênita dos vasos deferentes (CBAVD) ou ser saudável e fértil.⁽²⁵⁾

A sequência poliT é precedida por uma sequência de repetições TG que afeta a penetrância do alelo 5T,⁽²¹⁾ mas não dos alelos 7T e 9T.⁽²⁶⁾ O alelo 5T pode estar em cis com onze, doze ou treze repetições TG (TG11-T5, TG12-T5 e TG13-T5), e quanto maior o número de repetições TG, maior a quantidade de RNAm com ausência do exon 9.^(18,21,25,26) Quando uma mutação grave do CFTR está em trans com o alelo 5T, a chance de patogenicidade é 34 vezes maior na presença de TG13-5T quando comparada ao TG11-5T.⁽²⁵⁾

A mutação c.350G>A (R117H) é relativamente frequente nos pacientes com FC (1,1%), e está classificada pelo *Clinical and Functional Translation of CFTR* (CFTR2) como de relevância clínica variável.⁽²⁷⁾ O genótipo c.[350G>A;1210-12[5]] (R117H;5T) resulta em menos CFTR funcional do que c.[350G>A;1210-12[7]] (R117H;7T). Se R117H;5T está presente em heterozigose com uma mutação causadora de CF ou mesmo em homozigose, geralmente o indivíduo afetado apresenta FC pancreato-suficiente; já na presença de R117H;7T o indivíduo pode ter uma forma menos grave de FC, azoospermia ou ser saudável.⁽¹⁸⁾

1.5 Relação genótipo-fenótipo em fibrose cística

O impacto do genótipo do CFTR é diferente para os vários órgãos-alvo da doença. De modo geral, os pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para as mutações de classe I, II, III e VI apresentam doença mais grave do que os

pacientes com pelo menos uma mutação das classes IV e V, nas quais há função residual da proteína na membrana, uma vez que essas mutações são fenotipicamente dominantes quando em heterozigose com mutações das classes I, II, III e VI.^(18,28)

Os vasos deferentes são mais sensíveis à uma pequena redução na função do CFTR do que o pâncreas e os pulmões, respectivamente, e a CBAVD está presente em 95% dos pacientes com FC do sexo masculino.^(5,18,20,22)

A insuficiência pancreática ocorre quando menos de 2% do pâncreas exócrino é funcionante.⁽¹⁸⁾ Existe uma forte correlação entre genótipo e *status* pancreático: os pacientes com mutações das classes I, II, III e VI nos 2 alelos geralmente evoluem com insuficiência pancreática nos primeiros anos de vida, enquanto os pacientes com pelo menos 1 alelo com uma mutação de classe IV ou V têm grande probabilidade de se manterem pancreato-suficientes.^(5,18,20)

Pacientes com mutações das classes IV e V tendem a ter concentrações menores de cloro no suor, e algumas mutações específicas, como c.489+1G>T [621+1G->T], estão associadas a níveis muito mais altos do que os encontrados normalmente nos pacientes com FC.⁽²⁰⁾

Os pulmões são os órgãos com maior variabilidade clínica na FC. Um paciente com mutações das classes I, II, III e VI pode apresentar pouco comprometimento pulmonar enquanto um paciente com pelo menos uma mutação das classes IV e V pode evoluir com doença grave⁽¹⁸⁾ e mesmo pacientes com o mesmo genótipo podem apresentar grande variação na gravidade da doença pulmonar.⁽²⁰⁾ Como o genótipo apresenta correlação pobre com a gravidade da doença pulmonar ele não deve ser usado como um indicador de prognóstico.⁽¹⁸⁾

Aproximadamente 2 a 7% dos pacientes com FC tem doença hepática grave e pacientes com insuficiência pancreática e com uma mutação grave (classes I, II, III e VI) têm maior risco de desenvolvê-la.⁽⁵⁾ A prevalência do diabetes relacionado à FC aumenta com a idade do paciente e ocorre quase exclusivamente em pacientes pancreato-insuficientes, apresentando forte correlação com mutações graves.⁽¹⁹⁾

1.6 Doenças relacionadas ao CFTR

A CBAVD isolada é causa de infertilidade em 1 a 5% dos homens hígidos^(5,18,20) e está associada com pelo menos uma mutação do CFTR em 80 a 90% dos casos. A mutação c.1521_1523delCTT (F508del) está presente em 40% destes pacientes e o alelo 5T em aproximadamente 35%.⁽¹⁸⁾

A evidência da associação entre mutações do CFTR e CBAVD levou Cohn et al.⁽²⁹⁾ a avaliarem um possível papel do CFTR na pancreatite idiopática, evidenciando forte associação entre a presença de uma mutação do CFTR em heterozigose e desenvolvimento de pancreatite.⁽²⁹⁾ Aproximadamente 30% dos pacientes com pancreatite crônica idiopática têm pelo menos um alelo com mutação do CFTR, sendo a mutação c.1521_1523delCTT (F508del) a mais comum.⁽¹⁸⁾

O estudo de mutações do CFTR em pacientes com doença pulmonar supurativa isolada, com bronquiectasias disseminadas, mostrou uma frequência maior de mutações nestes pacientes do que esperado na população geral, porém raramente foram identificadas duas mutações em homozigose ou heterozigose composta.^(18,20)

1.7 Distribuição alélica

As mutações do CFTR têm distribuição geográfica bastante heterogênea. A alta frequência de portadores de mutações do CFTR, acima de 2%, sugere a existência de uma vantagem seletiva para indivíduos heterozigotos.^(30,31) A característica responsável por essa pressão seletiva ainda é incerta. Inicialmente foi proposto que a heterozigose era um fator protetor contra a desidratação por diarreias secretoras, como a causada pelo cólera,^(32,33) teoria que foi questionada por Högenauer et al. após estudos em humanos.⁽³⁴⁾ Estudos mais recentes levantam a hipótese de que a heterozigose é um fator protetor contra a tuberculose.^(31,35)

A mutação mais comum do CFTR, c.1521_1523delCTT (F508del), presente em aproximadamente 70% dos alelos, tem frequência bastante variável, chegando a 100% dos alelos nas Ilhas Faroé na Dinamarca e 20% na Turquia,^(30,36-39) com um gradiente decrescente de frequência do noroeste para o sudeste da Europa.^(3,18,38) O estudo dos haplótipos do CFTR mostrou que esta mutação surgiu há

mais de 52.000 anos em uma população geneticamente distinta da população europeia atual e foi introduzida neste continente em diferentes períodos por fluxos migratórios distintos, levando à heterogeneidade de sua distribuição.⁽³⁹⁾

Outras mutações comuns do CFTR também são mutações antigas e com origem única, que tiveram tempo para se disseminar,⁽³⁸⁾ como as mutações c.1624G>T (G542X), associada aos fenícios,⁽⁴⁰⁾ c.3909C>G (N1303K), relacionada a populações mediterrâneas e c.1652G>A (G551D), com origem em tribos celtas.⁽³⁸⁾

Algumas mutações são mais frequentes em determinadas populações do que na população geral pelo efeito fundador, como a mutação c.3302T>A (M1101K) nas comunidades huteritas,^(38,41) a mutação c.3846G>A (W1282X) nos judeus askenazi^(18,38,42) e a mutação c.262_263delTT (394delTT), que foi descrita como a “mutação nórdica” por Schwartz et al.⁽⁴³⁾ e é encontrada em uma frequência alta nos países que beiram o Mar Báltico.⁽³⁸⁾

Na Europa os países das regiões ocidental, setentrional e centro-oriental apresentam alto grau de homogeneidade das mutações do CFTR, devido à alta prevalência da mutação c.1521_1523delCTT (F508del); já países como Espanha, Bulgária, Grécia e Turquia têm maior diversidade de alelos, provavelmente relacionada a sua localização, por serem países que serviram como porta de entrada para outras populações.^(37,38)

A mutação c.1624G>T (G542X) é mais frequente nas regiões do mediterrâneo, principalmente no sul da Espanha e norte da África, regiões que correspondem a duas grandes cidades fenícias na antiguidade: Cartagena e Cartago, respectivamente. A mutação c.3909C>G (N1303K) tem distribuição semelhante à da G542X pois provavelmente também foi introduzida pela rota mediterrânea.⁽³⁸⁾

A mutação c.1652G>A (G551D) apresenta maior prevalência em regiões em que a população é descendente dos Celtas, como na Irlanda e na Bretanha, mas está difundida por toda a Europa, com frequências menores no sul e no leste europeu.^(37,38) A grande deleção c.54-5940_273+10250del21kb (CFTRdele2,3), por sua vez, é mais comum na Europa central e no leste europeu, principalmente em países em que grande parte da população tem origem eslava, como República Tcheca, Rússia, Polônia e Eslovênia.^(38,44)

Em relação às classes de mutações na Europa, 87,2% dos pacientes com alguma mutação identificada são portadores de pelo menos um alelo com uma mutação de classe II e 12,6% têm pelo menos um alelo com uma mutação

nonsense, mas esta proporção é significativamente maior em Israel (45,5%), na Itália (32,4%) e na Eslovênia (27,3%). As mutações de classe III foram identificadas somente em 3,9% dos pacientes, com maior prevalência na Irlanda (13,9%), Reino Unido (6,2%), República Tcheca (4,7%) e Bélgica (3,6%). Mutações de classe IV e V também foram encontradas com frequência menor, de 3,3 e 3,0%, respectivamente.⁽⁴⁵⁾

Nos Estados Unidos a distribuição alélica das mutações refletem a origem geográfica da população, com forte correlação com a população europeia. Neste país 10 mutações estão presentes em quase 80% dos alelos, entre elas F508del, G542X, G551D, W1282X e N1303K. A frequência da mutação c.1521_1523delCTT (F508del) nos Estados Unidos é de 72% nos pacientes caucasianos não-hispânicos, 55% nos caucasianos hispânicos e 44% nos afro-americanos.⁽⁴⁶⁾ Na população afro-americana a mutação c.2988+1G>A (3120+1G->A) é a segunda mais comum, presente em mais de 12% dos alelos.^(36,38) Nos caucasianos não-hispânicos e caucasianos hispânicos sua frequência alélica é de 0,08 e 0,16, respectivamente.⁽⁴⁶⁾ Esta mutação tem evidência de ter origem única⁽⁴⁷⁾ e na África do Sul sua frequência é estimada em 46% dos alelos de pacientes negros.^(38,48,49)

1.8 Panorama brasileiro

Há poucos estudos sobre genética em FC no Brasil, com poucas informações sobre a frequência de mutações e polimorfismos nos pacientes brasileiros ou sua distribuição no território nacional. Dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística de 2013 mostram que, dos 2.924 pacientes registrados, somente 1.187 (40,6%) realizaram algum tipo de pesquisa genética e somente 538 (18,3%) tiveram duas mutações causadoras de FC identificadas.⁽⁵⁰⁾

Devido à alta taxa de miscigenação, principalmente entre populações de origem indígena, africanas e europeias,⁽⁵¹⁾ é esperado que a frequência dos alelos no Brasil seja significativamente diferente das já descritas em populações norte-americanas e europeias. Também é esperado que a distribuição dos alelos seja heterogênea entre os estados brasileiros devido a fluxos migratórios distintos.⁽⁵¹⁾ Dados de 2014 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que neste ano 53,6% da população brasileira se declarava como preta ou parda e 45,5% como branca, com grande variação entre as diferentes regiões brasileiras.⁽⁵²⁾

Faucz et al. identificaram mutações do CFTR em 88,4% dos alelos de 56 pacientes caucasianos de Santa Catarina e do Paraná, estados onde grande parte da população tem origem europeia e há pouca miscigenação, usando as técnicas de pesquisa da mutação c.1521_1523delCTT (F508del), polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) e eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE). Houve identificação de duas mutações causadoras de FC em 45 (80%) pacientes e as mutações mais frequentes foram: c.1521_1523delCTT (F508del), c.1624G>T (G542X) e c.3909C>G (N1303K), com 45,5%, 6,3% e 4,5% dos alelos, respectivamente.⁽⁵³⁾

No Rio Grande do Sul, a pesquisa de 11 mutações por reação em cadeia da polimerase (PCR) em 77 pacientes identificou mutações em 84 (54,5%) alelos e o definiu o genótipo de 29 (37,7%) pacientes. Entre as mutações testadas, seis não foram identificadas em nenhum alelo e as duas mutações mais frequentes foram c.1521_1523delCTT (F508del), com 75 (48,7%) alelos, e c.1624G>T (G542X) com 5 (3,2%) alelos.⁽⁵⁴⁾

Em Campinas, no estado de São Paulo, a pesquisa de 6 mutações (F508del, G542X, N1303K, G551D, R553X e W1282X) por PCR em 96 pacientes identificou mutações em 58% dos alelos, com 18 (18,75%) dos pacientes homozigotos para c.1521_1523delCTT (F508del) e 60 (62,5%) heterozigotos para esta mutação.⁽⁵⁵⁾

Em 95 pacientes do Rio de Janeiro, a pesquisa de 9 mutações por PCR e a realização de SSCP identificou 11 mutações nestes pacientes, com caracterização de 45,2% dos alelos e do genótipo completo de 33 (34,7%) pacientes. Em 42 (44,2%) pacientes nenhuma mutação foi identificada. A mutação c.1521_1523delCTT (F508del) foi encontrada em 54 (28,4%) alelos e a segunda mutação mais frequente foi c.2988+1G>A (3120+1G->A) em 7 (3,7%) alelos.⁽⁵⁶⁾

Em Minas Gerais foram estudados 111 pacientes com diagnóstico de FC. A pesquisa de 8 mutações identificou o genótipo completo de 52 (47%) pacientes e nenhuma mutação em 12 (11%) pacientes. As mutações mais comuns foram: c.1521_1523delCTT (F508del), c.3484C>T (R1162X), c.1624G>T (G542X), c.2988+1G>A (3120+1G->A) e c.254G>A (G85E), nesta ordem.⁽⁵⁷⁾

Em 144 pacientes com FC na Bahia a mutação c.1521_1523delCTT (F508del) foi pesquisada por PCR e encontrada em somente 25 (8,6%) alelos. Não foram pesquisadas outras mutações neste estado.⁽⁵⁸⁾

No Pará, a pesquisa de 4 mutações (F508del, G551D, G542X e R553X) em 33 pacientes identificou a mutação c.1521_1523delCTT (F508del) em 15

(22,7%) alelos e c.1652G>A (G551D) em 2 (3%) alelos. Em 3 pacientes foram identificadas 2 mutações do CFTR, em 11 pacientes somente uma mutação em heterozigose, e em 19 pacientes nenhuma mutação.⁽⁵⁹⁾

1.9 Justificativa

O conhecimento do perfil genético da população brasileira com FC ainda é limitado, e não existem estudos nacionais utilizando a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), progressivamente mais acessível em termos de disponibilidade de equipamentos e custo. Além disso, o surgimento de novos tratamentos com foco na correção do defeito básico do CFTR⁽⁶⁰⁾ resulta na necessidade crescente do conhecimento do genótipo dos indivíduos afetados.

1.10 Hipótese

O sequenciamento de nova geração aliado ao MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) permitirá a identificação da maioria dos alelos nos pacientes com FC, com um perfil de mutações heterogêneo e distinto do já descrito em populações europeias e norte-americanas.

1.11 Objetivos

1. Avaliar a sequência completa das regiões codificadoras do gene CFTR de pacientes com fibrose cística e pacientes com suspeita de fibrose cística atípica ou doenças relacionadas ao CFTR.

2. Avaliar a associação entre mutações encontradas e parâmetros clínicos como idade ao diagnóstico, níveis de cloro no suor, insuficiência pancreática, complicações digestivas e endocrinológicas e função pulmonar.

2 MÉTODOS

2.1 Pacientes

Todos os pacientes com diagnóstico clínico de FC em seguimento no ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) foram convidados a participar do estudo. Foram também convidados a participar pacientes com suspeita de FC atípica ou doenças relacionadas ao CFTR, como pacientes com doença pulmonar supurativa crônica, pancreatite de repetição e valores limítrofes de cloro no suor. Os pacientes foram abordados durante a consulta de rotina no ambulatório.

Para participar do estudo os pais ou responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e os pacientes acima de 6 anos assinaram o Termo de Assentimento.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos por meio da revisão dos prontuários e organizados na Ficha de Dados Clínicos.

2.2 Coletas

Uma amostra de sangue (3mL) foi colhida no laboratório do Instituto da Criança, por punção venosa periférica em tubo EDTA em condições adequadas de assepsia. Os tubos foram identificados com a etiqueta do paciente contendo: nome do paciente, data de nascimento, data e hora da coleta e código de barras com número da coleta. Os frascos foram armazenados na geladeira do laboratório em recipiente próprio até a extração do DNA. As amostras foram colhidas de janeiro a agosto de 2014.

2.3 Extração do DNA e reação de sequenciamento

O DNA foi extraído do sangue periférico através do Kit QIAasymphony Virus Mini Kit[®] no equipamento QIAasymphony (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, no Laboratório de

Investigação Médica Core de Sequenciamento (LIM-46) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As regiões alvo do gene CFTR foram amplificadas usando o Ion AmpliSeq™ CFTR Panel (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), que é composto de 2 *pools* de *primers* para amplificação de 102 fragmentos (amplicons) em duas reações de PCR *multiplex*, que cobrem a região codificadora do gene e parte da região intrônica. Para amplificar cada biblioteca 4μL do 5X Ion AmpliSeq™ HiFi mix, 10μL do 2X Ion AmpliSeq™ primer pool, 10ng de DNA por reação (2μL da diluição 5ng/μL) e 4μL de água livre de nuclease foram misturados, totalizando 20μL. A seguinte ciclagem do PCR foi usada: 99°C por 2 minutos (denaturação inicial), 19 ciclos de 99°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 4 minutos (anelamento/extensão) e um *hold* a 10°C. As sequências de *primers* foram então parcialmente digeridas e adaptadores e *barcodes* foram ligados aos amplicons conforme as orientações do fabricante, usando o kit Ion Xpress™ barcode adapters 1-96 Kit (Life Technologies). As bibliotecas purificadas foram quantificadas com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Life Technologies) usando o kit Qubit® dsDNA HS assay kit.

O sequenciamento foi realizado no equipamento Ion Torrent PGM (Life Technologies) utilizando a técnica de semicondutores em chip. Foram realizadas 5 corridas: uma corrida inicial com 4 amostras e duas corridas com 11 amostras cada utilizando o chip Ion 314™ e mais duas corridas, uma com 62 e outra com 59 amostras, utilizando o chip Ion 318™, estas incluindo controles positivos e negativos.

Todos os procedimentos descritos acima foram realizados pelos biomédicos Vivian D. T. Niewiandonski (Diagnósticos da América S.A.) e Roberto Ribeiro (Instituto de Medicina Tropical - HCFMUSP).

O sequenciamento por Sanger e o MLPA foram realizados no laboratório de sequenciamento de nova geração do Hospital Israelita Albert Einstein pela equipe de NGS seguindo os protocolos da Instituição.

2.4 Análise bioinformática

A análise inicial dos dados obtidos nas corridas foi realizada em *software* próprio do equipamento Ion Torrent, denominado Ion Reporter (Life

Technologies, Carlsbad, CA, EUA), com alinhamento ao genoma de referência hg19 (Genome Reference Consortium GRCh37) usando a sequência de referência NM_000492.3 para o CFTR. Posteriormente, os dados brutos de todas as amostras (no formato .BAM) foram analisados no *software* Integrative Genomics Viewer 2.3.59 - IGV (Broad Institute, Cambridge, MA, EUA) em conjunto com o geneticista Guilherme Yamamoto (Instituto da Criança - HCFMUSP).

As informações referentes à patogenicidade das mutações foram obtidas dos bancos de dados *CFTR mutation database* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html>), CFTR2 (<http://www.cftr2.org/>) e ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Mutações não descritas nestas bases de dados foram também pesquisadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e em mecanismos de busca padrão na web (www.google.com).

2.5 Classificação das variantes

As variantes foram classificadas em: benignas, patogênicas, com significado clínico variável, com significado clínico desconhecido e não descritas. Uma mutação foi definida como patogênica se descrita no CFTR2 como *CF-causing*, se classificada como patogênica no ClinVar ou se descrita em heterozigose composta ou homozigose em pelo menos um paciente com fibrose cística no *CFTR mutation database*; mutações com significado clínico variável estavam descritas deste modo no CFTR2 e mutações com significado desconhecido são as que estavam descritas no *CFTR mutation database* em um indivíduo não portador de FC ou sem informações fenotípicas, no ClinVar sem informação sobre patogenicidade ou em artigo ou *abstract* publicado mas não no *CFTR mutation database*, CFTR2 ou ClinVar.

As mutações patogênicas, com significado clínico variável, com significado clínico desconhecido e as mutações novas possivelmente patogênicas foram também classificadas em mutações graves ou leves de acordo com seu mecanismo, classe e informações fenotípicas disponíveis no CFTR2. Mutações de classe I a III, mutações associadas à insuficiência pancreática em mais de 70% dos pacientes e mutações *nonsense*, foram consideradas graves. Os pacientes com FC foram então classificados em 3 grupos de acordo com seu genótipo: 2 mutações

graves (grave/grave), uma mutação grave e uma mutação leve (grave/leve) e uma mutação grave e uma mutação não classificada (grave/não classificada).

2.6 Disponibilização dos resultados

Os laudos dos exames foram configurados para conter informações sobre os achados e uma breve explicação do significado, sendo os nomes das mutações descritos de dois modos (nomenclatura cDNA e nomenclatura tradicional) conforme recomendação da *Human Genome Variation Society*.⁽⁶¹⁾ Todos os laudos foram revisados pela autora e orientador e impressos em duas vias, uma assinada pelos pais e armazenada no prontuário do paciente e outra entregue a eles durante suas consultas de rotina. Além disso, os dados de genética de todos os pacientes foram atualizados na base do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC).

2.7 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi feita com o cálculo da distribuição da frequência para as variáveis categóricas e o cálculo de média, mediana, intervalo interquartil e limites máximo e mínimo para as variáveis numéricas.

As associações foram verificadas por meio de testes exatos de Fisher, de Kruskal-Wallis (para comparar variáveis numéricas entre três grupos), de Mann-Whitney (para comparar variáveis numéricas entre grupos) e de Jonckheere-Terpstra (para verificar tendências de medianas na comparação de grupos ordinais).

Todos os cálculos foram realizados com o *software* R v3.1.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), com apoio da estatística Ana Carolina Mafra (núcleo de apoio ao pesquisador, Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein). O nível de significância adotado foi de 5%.

3 RESULTADOS

Participaram do estudo 141 pacientes, 126 com diagnóstico de FC e 15 com suspeita de FC atípica ou doença relacionada ao CFTR. As características clínicas dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais dos pacientes com fibrose cística

Características	n	
Sexo masculino [#]	126	75(59,5)
Idade - anos ^δ	126	10,5(4,7-14,3)
Idade ao diagnóstico - anos ^δ	126	0,5(0,1-2,5)
Tripsina imunorreativa - ng/mL ^δ	45	167(137-239)
Cloro no suor - mmol/L ^δ	108	92,5(79,7-108)
Condutividade no suor - mmol/L ^δ	23	115(110-120)
Íleo meconial [#]	126	16(12,7)
Síndrome de obstrução intestinal distal [#]	126	10(7,9)
Insuficiência pancreática [#]	126	117(92,9)
VEF1* aos 7 anos - % do predito ^δ	46	79,5(69,5-99,2)
VEF1* aos 14 anos - % do predito ^δ	35	65(49-100)
Transplante pulmonar [#]	126	4(3,2)
Gastrostomia [#]	126	5(4,0)
Dependência de oxigênio [#]	126	12(9,5)
Diabetes [#]	126	9(7,1)
Hepatopatia [#]	126	43(34,1)

^δMediana (p25-75). [#]n (%). *VEF1: Volume expiratório forçado no 1º segundo.

A tabela 2 mostra informações referentes às medicações de uso crônico pelos pacientes com FC.

Tabela 2. Medicações de uso crônico pelos pacientes com fibrose cística

Medicação	n (%)
Dornase alfa	94(74,6)
NaCl 3% inalatório	13(10,3)
NaCl 7% inalatório	26(20,6)
Tobramicina inalatória	26(20,6)
Colistina inalatória	3(2,4)
Dose de pancrelipase (UI/kg/dia)	
< 5.000	41(35,9)
5.000-10.000	35(30,7)
> 10.000	38(33,3)
Azitromicina 3x/semana	28(22,2)

*n=126.

A colonização crônica de vias aéreas nos pacientes com FC, caracterizada pela presença do microrganismo em mais da metade das culturas de orofaringe ou escarro no último ano, está apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Colonização crônica das vias aéreas dos pacientes com fibrose cística

Microrganismo	n (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina	60(48,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21(16,8)
<i>Burkholderia cepacia</i>	13(10,3)
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina	7(5,5)

*n=125.

No total de pacientes avaliados no estudo, inicialmente identificamos 43 mutações relevantes em 247 alelos, sendo 31 patogênicas, 2 com significado clínico variável, 4 com significado clínico desconhecido e 6 não descritas. A mutação c.(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del (CFTRdele17a-18), uma grande deleção, foi identificada em um paciente por MLPA e a mutação c.43_44insT (175insT), presente em uma região de repetição, precisou de confirmação por Sanger em outro paciente (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência dos alelos encontrados em todos os pacientes incluídos no estudo

Mutação		Número de alelos (%)
Nomenclatura cDNA	Nomenclatura tradicional	
c.1521_1523delCTT	F508del	147(59,5)
c.1624G>T	G542X	18(7,2)
c.2988+1G>A	3120+1G->A	13(5,2)
c.1647T>G	S549R	8(3,2)
c.11C>A	S4X	6(2,4)
c.3196C>T	R1066C	5(2,0)
c.254G>A	G85E	3(1,2)
c.254G>T	G85V	2(0,8)
c.443T>A	I148N	2(0,8)
c.772A>G	R258G	2(0,8)
c.1000C>T	R334W	2(0,8)
c.1519_1521delATC	I507del	2(0,8)
c.1657C>T	R553X	2(0,8)
c.1682C>A	A561E	2(0,8)
c.1766G>A	S589N	2(0,8)
c.1936G>T	G646X	2(0,8)
c.2051_2052delAAinsG	2183delAA->G	2(0,8)

continua...

...continuação

c.3472C>T	R1158X	2(0,8)
c.3484C>T	R1162X	2(0,8)
c.-9_14del23bp	124del23bp	1(0,4)
c.43_44insT	175insT	1(0,4)
c.350G>A	R117H	1(0,4)
c.579+1G>T	711+1G->T	1(0,4)
c.580-2A>C	712-2A->C	1(0,4)
c.613C>T	P205S	1(0,4)
c.617T>G	L206W	1(0,4)
c.619C>T	Q207X	1(0,4)
c.658C>T	Q220X	1(0,4)
c.743+1G>A	875+1G->A	1(0,4)
c.785C>T	Y262I	1(0,4)
c.825C>G	Y275X	1(0,4)
c.859_863delAACT T	991del5	1(0,4)
c.1084_1088dup	S364insTATGA	1(0,4)
c.1585-1G>A	1717-1G->A	1(0,4)
c.1680-1G>A	1812-1G->A	1(0,4)
c.2052_2053insA	2184insA	1(0,4)
c.2052delA	2184delA	1(0,4)
c.2476G>T	E826X	1(0,4)
c.(2988+1_2989- 1)_(3468+1_3469- 1)del	CFTRdele17a-18	1(0,4)
c.2989-1G>A	3121-1G->A	1(0,4)
c.3454G>C	D1152H	1(0,4)
c.3528delC	3659delC	1(0,4)
c.3728T>A	L1243X	1(0,4)
c.3874-1G>A	4006-1G>A	1(0,4)
c.4168delC	4300delC	1(0,4)

Foram identificadas mutações do CFTR em 97,2% dos alelos de pacientes com diagnóstico de FC, com identificação de pelo menos duas mutações em 122 pacientes. Em 111 deles, foram identificadas duas mutações patogênicas, em 6 pacientes uma mutação patogênica e uma mutação com significado clínico desconhecido, e em 5 pacientes foram identificadas uma mutação patogênica e uma mutação não descrita (Figura 3). Um paciente apresentou uma mutação exônica não descrita (c.785C>T [Y262I]) além de duas mutações patogênicas. Um paciente apresentou somente uma mutação em heterozigose, e em 3 pacientes não foi identificada nenhuma mutação patogênica (Figura 3).

Figura 3. Classificação das mutações encontradas nos pacientes com fibrose cística

A mutação c.1521_1523delCTT (F508del) foi a mais frequente entre os pacientes com FC, com frequência alélica de 57,5%, observando-se 49 (38,8%) pacientes homozigotos e 47 (37,3%) pacientes heterozigotos para esta mutação. As outras duas mutações mais frequentes foram c.1624G>T (G542X) e c.2988+1G>A (3120+1G->A) (Figura 4). As mutações de classe I (*nonsense*) corresponderam à 14% dos alelos, com 34 (26,9%) pacientes com identificação de pelo menos uma mutação desta categoria.

Figura 4. Distribuição alélica nos pacientes com fibrose cística

As mutações com significado clínico desconhecido identificadas entre os pacientes foram c.443T>A (I148N), c.772A>G (R258G), c.1936G>T (G646X) e c.3874-1G>A (4006-1G->A) e as mutações não descritas na literatura foram c.580-2A>C (712-2A->C), c.785C>T (Y262I), c.1084_1088dup (S364insTATGA), c.2476G>T (E826X), c.3728T>A (L1243X) e c.4168delC (4300delC) (Tabela 5).

Tabela 5. Mutações novas

Mutação		Tipo de mutação
Nomenclatura cDNA	Nomenclatura tradicional	
c.580-2A>C	712-2A->C	Mutação em sítio de <i>splicing</i>
c.785C>T	Y262I	<i>Missense</i>
c.1084_1088dup	S364inssTATGA	Inserção <i>frameshift</i>
c.2476G>T	E826X	<i>Nonsense</i>
c.3728T>A	L1243X	<i>Nonsense</i>
c.4168delC	4300delC	Deleção <i>frameshift</i>

No grupo de pacientes com suspeita de FC atípica ou doença relacionada ao CFTR encontramos um paciente com duas mutações, sendo uma patogênica (c.1521_1523delCTT [F508del]) e uma com relevância clínica desconhecida (c.443T>A [I148N]), um paciente heterozigoto para uma mutação de relevância clínica variável (c.350G>A [R117H]) e um paciente heterozigoto para a mutação c.1521_1523delCTT (F508del). Os demais pacientes não apresentaram mutações relevantes.

Quarenta e três mutações foram avaliadas em relação à gravidade, sendo 29 mutações graves, 4 mutações leves e 10 não classificadas (Tabela 6). O genótipo de 103 (81,7%) pacientes foi classificado como grave/grave, de 5 (4,1%) pacientes como grave/leve e de 14 (11,5%) pacientes como grave/não classificado.

Tabela 6. Classificação das mutações em relação à gravidade

Graves	Leves	Não classificadas
c.-9_14del23bp (124del23bp)	c.613C>T (P205S)	c.43_44insT (175insT)
c.11C>A (S4X)	c.617T>G (L206W)	c.254G>T (G85V)
c.254G>A (G85E)	c.1000C>T (R334W)	c.443T>A (I148N)
c.579+1G>T (711+1G->T)	c.3454G>C (D1152H)	c.580-2A>C (712-2A->C)
c.619C>T (Q207X)		c.743+1G>A (875+1G->A)
c.658C>T (Q220X)		c.772A>G (R258G)
c.825C>G (Y275X)		c.1084_1088dup (S354insTATGA)
c.859_863delAACTT (991del5)		c.1766G>A (S589N)
c.1519_1521delATC (I507del)		c.3874-1G>A (4006-1G>A)
c.1521_1523delCTT (F508del)		c.4168delC (4300delC)
c.1585-1G>A (1717-1G->A)		
c.1624G>T (G542X)		
c.1647T>G (S549R)		
c.1657C>T (R553X)		
c.1680-1A>G (1812-1A->G)		
c.1682C>A (A561E)		
c.1936G>T (G646X)		
c.2051_2052delAAinsG (2183delAA->G)		
c.2052_2053insA (2184insA)		
c.2052delA (2184delA)		
c.2476G>T (E826X)		
c.(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del (CFTRdel17a-18)		
c.2988+1G>A (3120+1G->A)		
c.2989-1G>A (3121-1G>A)		
c.3196C>T (R1066C)		
c.3472C>T (R1158X)		
c.3484C>T (R1162X)		
c.3528delC (3659delC)		
c.3728T>A (L1243X)		

Cinquenta e dois pacientes incluídos tinham algum resultado prévio de pesquisa genética, sendo 21 homozigotos c.1521_1523delCTT (F508del), 17 com essa mutação identificada em apenas um alelo e sem mutação identificada no outro alelo, além de sete com outros genótipos. Sete pacientes homozigotos c.1521_1523delCTT (F508del) tinham pesquisa prévia das mutações F508del e G542X, realizada em nossa Instituição por técnica de PCR com resultado **negativo** (sendo quatro destes com exames posteriores realizados em laboratórios privados confirmando o genótipo F508del/F508del). Nossos resultados foram concordantes com os anteriores e permitiram a identificação de uma segunda mutação em 19 pacientes (Tabela 7).

Tabela 7. Relação entre genótipo prévio e pós-sequenciamento

Genótipo prévio (n)	Genótipo após sequenciamento/MPLA (n)
F508del/F508del (21)	F508del/F508del (21)
F508del/G542X (3)	F508del/G542X (3)
F508del/Q220X (1)	F508del/Q220X (1)
F508del/- (17)	F508del/ S549R (2)
	F508del/ G542X (2)
	F508del/ F508del (1)
	F508del/ L206W (1)
	F508del/ 4006-1G->A (1)
	F508del/ 175insT (1)
	F508del/ R1162X (1)
	F508del/ S4X (1)
	F508del/ Q207X (1)
	F508del/ 3120+1G->A (1)
	F508del/ A561E (1)
	F508del/ R553X (1)
	F508del/ Y275X (1)
	F508del/ 124del23bp (1)
	F508del/- (1)
G542X/- (1)	G542X/ S549R (1)
R334W/- (1)	R334W/ L1243X (1)
3659delC/- (1)	3659delC/ CFTRdele17a-18 (1)

As comparações entre os grupos de genótipos grave/grave e grave/leve e variáveis categóricas estão apresentados na tabela 8 e as comparações entre os grupos de genótipos e variáveis numéricas na tabela 9.

Tabela 8. Variáveis categóricas estudadas por grupos de genótipo

Variáveis	Genótipo		Valor de p
	Grave/grave (n=103) n(%)	Grave/leve (n=5) n(%)	
Status pancreático			
Insuficiente	101(98,1)	2(40,0)	<0,001
Suficiente	2(1,9)	3(60,0)	
Íleo meconial			
Não	87(84,5)	5(100,0)	>0,999
Sim	16(15,5)	0(0,0)	
DIOS*			
Não	94(91,3)	5(100,0)	>0,999
Sim	9(8,7)	0(0,0)	
Diabetes			
Não	94(91,3)	5(100,0)	>0,999
Sim	9(8,7)	0(0,0)	
Hepatopatia			
Não	64(62,1)	4(80,0)	0,649
Sim	39(37,9)	1(20,0)	
Colelitíase			
Não	91(88,3)	4(80,0)	0,480
Sim	12(11,7)	1(20,0)	
Pancreatite			
Não	103(100,0)	4(80,0)	0,046
Sim	0(0,0)	1(20,0)	
Oxigenoterapia			
Não	93(90,3)	4(80,0)	0,422
Sim	10(9,7)	1(20,0)	
Gastrostomia			
Não	98(95,1)	5(100,0)	>0,999
Sim	5(4,9)	0(0,0)	
Transplante pulmonar			
Não	100(97,1)	5(100,0)	>0,999
Sim	3(2,9)	0(0,0)	
Uso de dornase alfa			
Não	20(19,4)	3(60,0)	0,064
Sim	83(80,6)	2(40,0)	
Inalação com NaCl 3%			
Não	93(90,3)	4(80,0)	0,422
Sim	10(9,7)	1(20,0)	
Inalação com NaCl 7%			
Não	81(78,6)	4(80,0)	>0,999
Sim	22(21,4)	1(20,0)	

*DIOS: síndrome de obstrução intestinal distal (*distal intestinal obstruction syndrome*).

Tabela 9. Variáveis numéricas estudadas por grupos de genótipo

Variáveis	Genótipo		Valor de p
	Grave/grave (n=103)	Grave/leve (n=5)	
Idade ao diagnóstico - anos	0,41 (0,16-2,12)	1,41 (0,75-9,25)	0,082
Tripsina imunorreativa - ng/mL	173,50 (147,25-250,25)	116,00 (78,50-130,50)	0,025
Cloro no suor - mmol/L	93,50 (80,00-109,75)	76,00 (75,00-81,50)	0,068
Condutividade no suor - mmol/L	114,50 (110,00-119,00)	122,50 (121,25-123,75)	0,058
VEF1* aos 7 anos - % predito	81,00 (70,50-100,50)	nd	nd
VEF1* aos 14 anos - % predito	65,00 (49,00-102,50)	74,50 (65,75-83,25)	0,966
Idade no primeiro isolamento de <i>P. aeruginosa</i> - anos	1,54 (0,80-4,81)	9,66 (5,91-11,66)	0,064

Valores apresentados em mediana (p25-75). nd: sem dados; *VEF1: volume expiratório forçado no 1º segundo.

Foram também avaliadas associações entre *status* pancreático e íleo meconial com alguns parâmetros clínicos (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Associação entre características clínicas e *status* pancreático

Características	n	Status pancreático		Valor de p
		Insuficiente (n=117)	Suficiente (n=9)	
Idade ao diagnóstico - anos	126	0,50 (0,16-2,25)	2,66 (0,75-8,83)	0,070
Cloro no suor - mmol/L	108	93,00 (80,00-108,25)	89,00 (75,00-102,00)	0,398
VEF1* aos 7 anos - % predito	46	81,00 (69,00-100,00)	76,00	0,706
VEF1* aos 14 anos - % predito	35	59,50 (47,00-99,00)	92,00 (85,50-97,00)	0,289
Idade no primeiro isolamento de <i>P. aeruginosa</i> - anos	106	1,66 (0,81-5,50)	3,50 (2,83-9,83)	0,076

Valores apresentados em mediana (p25-75). *VEF1: volume expiratório forçado no 1º segundo.

Tabela 11. Associação entre características clínicas e íleo meconial

Características	n	Íleo meconial		Valor de p
		Não	Sim	
Idade ao diagnóstico - anos ^δ	126	0,66 (0,25-3,16)	0,20 (0,16-0,35)	0,004[#]
Cloro no suor - mmol/L ^δ	108	92,00 (78,50-109,50)	93,00 (87,00-98,00)	0,791 [#]
VEF1* aos 7 anos - % predito ^δ	46	79,5 (70,50-102,25)	79,5 (63,75-81,75)	0,396 [#]
VEF1* aos 14 anos - % predito ^δ	35	67,00 (51,00-102,00)	50,50 (63,75-81,75)	0,303 [#]
Idade no primeiro isolamento de <i>P aeruginosa</i> - anos ^δ	106	2,25 (0,91-5,66)	0,83 (0,58-2,70)	0,022[#]
DIOS ^{+β}	126			
Não		108 (98,1)	8 (50,0)	<0,001^Ω
Sim		2 (1,9)	8 (50,0)	
Status pancreático ^β	126			
Insuficiente		101 (91,8)	16 (100,0)	0,602 ^Ω
Suficiente		9 (8,2)	0 (0,0)	

^δValores apresentados em mediana (p25-75). ^βn (%). *VEF1: volume expiratório forçado no 1º segundo; ⁺DIOS: *distal intestinal obstruction syndrome* (síndrome de obstrução intestinal distal).

[#]Valor de p referente ao teste de Mann-Whitney. ^ΩValor de p referente ao teste exato de Fisher.

4 DISCUSSÃO

A técnica de sequenciamento de nova geração isolada nos permitiu identificar mutações do CFTR em 96,4% dos alelos dos pacientes com FC, e, quando aliada às técnicas de MLPA e Sanger, em 97,2% dos alelos, com identificação de duas mutações em 96,8% dos pacientes, resultados que ainda não haviam sido obtidos em uma população brasileira.^(51,54-59)

Conforme esperado, encontramos um perfil de mutações heterogêneo e distinto do descrito em populações europeias e norte americanas.^(36-38,46) A mutação c.1521_1523delCTT (F508del) foi identificada em 57,5% dos alelos, frequência maior do que já relatada em outros estudos brasileiros,^(50,53-59) porém menor do que a encontrada na América do Norte e Europa.^(37,38,46) A segunda mutação mais comum em nossos pacientes, c.1624G>T (G542X), foi encontrada em 7,2% dos alelos, em contraste com 2,5% dos alelos da base de dados CFTR2,⁽²⁷⁾ possível reflexo da migração de espanhóis e italianos para o Brasil.^(37,38,51) A mutação c.2988+1G>A (3120+1G->A), terceira mais comum neste estudo (5,2% dos alelos), é menos frequente na população geral (0,33% dos alelos na base dados CFTR2) mas bastante frequente em negros.^(38,46-48) No Registro Brasileiro de Fibrose Cística, esta mutação está presente em somente 0,5% dos alelos,⁽⁵⁰⁾ discrepância que pode ser decorrente dos métodos utilizados na genotipagem dos pacientes cadastrados no registro, evidenciando a necessidade de conhecermos o perfil genético brasileiro e adequarmos os métodos diagnósticos à nossa população.

Se tivéssemos usado o painel de 23 mutações recomendado pelo *American College of Medical Genetics* para caucasianos não-hispânicos,⁽⁶²⁾ 32 mutações não teriam sido identificadas, 40 pacientes teriam somente uma mutação identificada e 7 pacientes não teriam nenhuma mutação identificada e, mesmo usando um painel de 102 mutações, ainda teríamos 26 mutações não identificadas, 34 pacientes com identificação de somente uma mutação e 4 pacientes sem nenhuma mutação identificada. Estes dados corroboram a hipótese de que o uso de painéis de mutações não é a abordagem mais efetiva em uma população tão heterogênea como a nossa.

A mutação c.785C>T (Y262I), não descrita na literatura, provavelmente é uma mutação benigna, pois foi encontrada em um paciente com duas

outras mutações patogênicas identificadas (c.1647T>G e c.1766G>A [S549R e S589N]) e não foi identificada em sua irmã, também portadora de FC com o genótipo c.[1647T>G(+)]1766G>A] (S549R/S589N). Já as outras mutações novas identificadas, c.580-2A>C (712-2A->C), c.1084_1088dup (S364insTATGA), c.2476G>T (E826X), c.3728T>A (L1243X) e c.4168delC (4300delC), podem ser presumidas patogênicas sem necessidade de testes funcionais, por serem mutações nos sítios doadores e receptores de *splicing*, mutações *nonsense* e deleções e inserções *frameshift*, que impedem a produção da proteína pelo mecanismo NMD (*nonsense mediated decay*) do RNAm.^(18,63)

As mutações com significado clínico desconhecido c.772A>G (R258G), c.1936G>T (G646X) e c.3874-1G>A (4006-1G->A), foram identificadas em heterozigose com mutações patogênicas em pacientes com FC, sendo provavelmente causadoras da doença. A mutação c.443T>A (I148N) já havia sido descrita em um paciente brasileiro, mas sem informações fenotípicas.⁽¹⁷⁾ Nós identificamos esta mutação em heterozigose com c.1521_1523delCTT (F508del) e na presença do polimorfismo 5T em duas pacientes pancreato-suficientes e com doença pulmonar leve, uma com diagnóstico de FC e outra com suspeita de FC atípica, sendo esta última com dosagens limítrofes de cloro no suor. É possível que esta mutação tenha relevância clínica variável, causando FC quando em cis com o polimorfismo 5T, com fenótipo mais leve ou quadro atípico, de modo semelhante ao descrito para a mutação c.350G>A (R117H).⁽¹⁸⁾

Quanto aos 3 pacientes em que não foi identificada nenhuma mutação mesmo após o MLPA, é possível que não sejam de fato portadores da doença. A revisão de seus dados clínicos mostrou que um deles tinha valores de cloro no suor significativamente abaixo de 60mEq/L (média 34mEq/L), e os outros apresentavam características clínicas de relevância questionável para configurar FC, apesar de dosagens de cloro no suor acima de 60mEq/L. O MLPA não pôde ser realizado no paciente em que foi identificada somente uma mutação em heterozigose, mas ele também apresenta quadro clínico questionável para FC, com 6 dosagens de cloro no suor negativas ou indeterminadas e duas positivas (61 e 75mmol/L). Também é possível que estes pacientes tenham mutações intrônicas não identificadas, como c.1679+1.6kbA>G (1811+1.6kbA->G) e c.3717+12191C>T (3849+10kbC->T).

Entre os pacientes com suspeita de FC atípica ou doença relacionada ao CFTR, uma paciente, já descrita acima, foi caracterizada com portadora

de FC e outra como portadora assintomática da mutação c.350G>A (R117H). Identificamos também uma paciente heterozigota c.1521_1523delCTT (F508del) com história de pancreatite de repetição, possivelmente relacionada ao CFTR, visto que aproximadamente 30% dos pacientes com pancreatite idiopática de repetição têm pelo menos um alelo com uma mutação do CFTR.⁽¹⁸⁾

Em relação às características clínicas dos pacientes com FC, a casuística incluída é de população pediátrica, com mediana de idade de 10,5 anos e diagnóstico precoce (mediana de 6 meses de vida), possível reflexo da inclusão da triagem para FC no programa de triagem neonatal no estado de São Paulo desde fevereiro de 2010. A maioria dos pacientes, 92,9%, são pancreato-insuficientes, 12,7% tiveram íleo meconial e 7,9% síndrome de obstrução intestinal distal, prevalências concordantes com as descritas na literatura para estas complicações.^(20,64) Em relação ao diabetes relacionado à FC encontramos 7,1% do total de pacientes com esta complicação, provavelmente devido à menor idade de nossos pacientes, já que a prevalência de diabetes relacionado à FC aumenta com a idade, afetando um quinto dos adolescentes com FC.⁽²⁸⁾

A análise comparativa entre os genótipos encontrados e as características fenotípicas e de tratamento da nossa população foi dificultada pelo baixo número de pacientes com pelo menos uma mutação leve. A diferença significativa observada entre os grupos quanto ao *status* de insuficiência pancreática, com maior proporção de pacientes pancreato-suficientes no grupo de genótipo grave/leve, foram achados esperados e bem descritos na literatura.^(3,5,20,65) Quanto à ocorrência de pancreatite aguda, a diferença estatística observada deve ser interpretada à luz de termos identificado apenas um paciente com genótipo grave/leve com esta complicação rara da FC, fenômeno também amplamente descrito na literatura em pacientes pancreato-suficientes, com risco de 20% de desenvolvimento da complicação neste grupo.⁽⁵⁾ Os valores de tripsina imunorreativa (IRT) foram significativamente mais baixos nos pacientes com genótipo grave/leve, e notamos uma tendência ao diagnóstico mais tardio e valores de cloro no suor mais baixos neste grupo, apesar das diferenças não serem significativas do ponto de vista estatístico. É possível que o diagnóstico nestes pacientes seja dificultado pelo quadro clínico mais leve, assim como pelos valores mais baixos de tripsina IRT e cloro no suor.

Ao compararmos o *status* pancreático com parâmetros clínicos (Tabela 11), apesar de não detectarmos diferenças significativas, notamos que as

medanas de idade ao diagnóstico e no primeiro isolamento de *P aeruginosa* são menores no grupo insuficiente, assim como o valor de VEF1 aos 14 anos, o que é esperado em pacientes com doença mais grave.

Os pacientes com íleo meconial ao nascer têm diagnóstico mais precoce, o que é esperado uma vez que esta é uma complicação típica de FC.⁽⁶⁴⁾ A menor idade no primeiro isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* nestes pacientes pode ser reflexo tanto do diagnóstico precoce, com início de coleta de culturas de vigilância, quanto pela apresentação mais precoce e grave da doença. Identificamos também uma correlação importante entre íleo meconial e síndrome de obstrução intestinal distal, com 50% dos pacientes com íleo meconial desenvolvendo síndrome de obstrução intestinal distal.

As principais limitações deste estudo estão relacionadas à amostra e à metodologia utilizada. Como analisamos o genótipo de pacientes de um único centro de referência na cidade de São Paulo, estes resultados podem não ser representativos de toda a população brasileira, ainda que o Estado de São Paulo seja um dos grandes receptores de fluxos migratórios da região norte e nordeste do país. Mesmo assim, é possível imaginar diferentes frequências alélicas de mutações do CFTR nos outros estados brasileiros, sendo desejável a realização de estudos mais amplos de sequenciamento do CFTR em pacientes com FC provenientes de todo o território nacional. A análise das relações entre genótipo-fenótipo foi dificultada pelo tamanho da amostra, com um número muito reduzido de pacientes com identificação de mutações leves, mais raras. Neste sentido, a inclusão de pacientes adultos acompanhados no HCFMUSP e recentemente avaliados em estudo de sequenciamento do gene CFTR (Rodrigo Abensur Athanazio, comunicação pessoal), poderia resultar em modificação do volume e distribuição da casuística quanto à gravidade das mutações, permitindo uma análise mais consistente. Quanto à metodologia utilizada, a plataforma Ion Torrent apresenta dificuldade de leitura em regiões de repetições de bases,⁽⁶⁶⁾ tendo sido escolhida inicialmente por questões de custo/benefício e disponibilidade na Instituição. Além disso, é preciso esclarecer que o sequenciamento das regiões codificadoras do gene por NGS, ainda que incluindo complementação com pesquisa de rearranjos e grandes deleções por MLPA, pode não ser capaz de identificar mutações intrônicas em regiões reguladoras do gene, sendo esperado que 1-5% dos alelos não sejam identificados mesmo com o uso destas técnicas.⁽¹⁸⁾

Na última década houve um aumento da disponibilidade de técnicas mais avançadas de genotipagem, com maior acesso aos equipamentos e diminuição significativa dos custos,⁽⁶⁷⁾ o que deve levar ao aumento do uso de tais técnicas na prática clínica nos próximos anos. Porém o sequenciamento de nova geração pode não ser uma solução tão simples quanto parece, gerando grande quantidade de dados que exigem expertise para a análise das variantes encontradas, tanto das já descritas quanto das novas, dos dados brutos e interpretação de resultados negativos. Em alguns casos, como em áreas de homopolímeros e regiões com baixa cobertura, é necessária a confirmação das variantes por Sanger ou a complementação da análise por outras técnicas, como o MLPA.

Em populações com distribuição alélica do CFTR mais homogênea a estratégia mais usada para genotipagem é o uso de painéis de mutações, sendo usado, inclusive, para confirmação diagnóstica após um IRT positivo no período neonatal em algumas regiões.⁽⁴⁾ O painel ideal deveria ter uma taxa de detecção de mutações superior a 95%, mas a heterogeneidade do CFTR torna difícil atingir este resultado,⁽¹⁸⁾ de modo que nos Estados Unidos um painel com 23 mutações identifica 88% dos alelos em caucasianos não-hispânicos.⁽⁴⁶⁾

No Brasil, Marson et al. propuseram a pesquisa da mutação c.1521_1523delCTT (F508del) como abordagem inicial para genotipagem dos pacientes com FC, uma vez que em 26,7% de seus pacientes esta mutação estava presente em homozigose e em 37,2% em heterozigose.⁽⁶⁸⁾ Levando em conta que entre nossos pacientes 38,8% são homozigotos e 37,3% são heterozigotos para esta mutação e que em outros estudos brasileiros sua frequência é de 8,6 a 48,7% dos alelos⁽⁵⁴⁻⁵⁹⁾ esta estratégia pode ser custo-efetiva como uma etapa inicial, evitando o uso de técnicas moleculares mais caras e complexas em pacientes homozigotos c.1521_1523delCTT (F508del). Considerando que os painéis de 23 e 102 mutações identificariam duas mutações somente em 59,5% e 66% dos pacientes e não são estratégias baratas e usualmente cobertas pelos planos de saúde, pode ser mais adequado prosseguir com o sequenciamento da região codificadora do CFTR para os pacientes que continuarem sem genótipo definido após a pesquisa de F508del, seguido pela realização de MLPA quando necessário.

As descobertas de outros genes que podem causar doença semelhante à FC, como mutações na subunidade beta do canal de sódio ENaC, levando ao aumento da absorção de sódio nas vias aéreas⁽⁶⁹⁾ e de genes

modificadores como o ATP12a, que na ausência de CFTR funcional age acidificando o líquido periciliar e predispondo o indivíduo com FC à infecção de vias aéreas,⁽⁷⁰⁾ exemplificam a necessidade de olharmos além do CFTR ao estudar pacientes com FC e novas possibilidades terapêuticas.

Entre os pacientes com FC avaliados neste estudo, 57 são candidatos a novas terapêuticas já aprovadas fora do Brasil, sendo 49 pacientes homozigotos F508del (lumacaftor/ivacaftor) e 8 pacientes com pelo menos um alelo com as mutações S549R ou S589N (ivacaftor); além de 34 pacientes com pelo menos uma mutação *nonsense*, com novas drogas em estudo. Apesar destas medicações ainda não estarem disponíveis em nosso meio, estes dados reafirmam que o conhecimento do genótipo de nossos pacientes é essencial.

5 CONCLUSÕES

1. O sequenciamento de nova geração aliado a *multiplex ligation-dependent probe amplification* possibilitou a definição do genótipo da maioria dos pacientes acompanhados em nosso ambulatório, demonstrando diferenças significativas entre a prevalência de mutações do CFTR em nossos pacientes e populações norte-americanas e europeias.

2. Foi possível identificar 6 mutações novas no gene CFTR, sendo 5 delas possivelmente patogênicas e causadoras de fibrose cística.

3. A análise comparativa entre os genótipos encontrados e parâmetros clínicos evidenciou maior proporção de pacientes pancreato-suficientes e com pancreatite entre os pacientes com uma mutação leve, assim como valores menores de IRT neste grupo de pacientes.

6 REFERÊNCIAS

1. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1214:57-69. Review.
2. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest.* 2011;139(6):1480-90. Review.
3. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373(9678):1891-904. Review.
4. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008;153(2):S4-S14.
5. Lommatzsch ST, Aris R. Genetics of cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2009;30(5):531-8. Review.
6. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem.* 2012;45(15):1132-44. Review.
7. Andersen D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child.* 1938;56(2):344-99.
8. Lowe CU, May CD, Reed SC. Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features. *Am J Dis Child.* 1949;78(3):349-74.
9. Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics.* 1953;12(5):549-63.
10. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989;245(4925):1437.
11. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989;245(4922):1073-80.
12. Turnbull EL, Rosser MF, Cyr DM. The role of the UPS in cystic fibrosis. *BMC Biochem.* 2007;8 Suppl 1:S11. Review.
13. Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A, Cyr DM. The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* 1999;18(6):1492-505.
14. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52:15-25. Review.
15. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature.* 2006;440(7083):477-83. Review.
16. Hwang TC, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(1):a009498.

17. Cystic Fibrosis Mutation Database CFTR1 [Internet]. Toronto (Canada): Hospital for Sick Children; 2011 [updates 2011 Apr 25; cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>
18. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):179-96. Review.
19. Cutting GR, Zeitlin PL. Genetics and pathophysiology of cystic fibrosis. In: Wilmott RW, Boat TF, Bush A, Chernick V, Deterding RR, Ratjen F. *Kendig and Chernick's disorders of the respiratory tract in children*. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2012.
20. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):117-33. Review.
21. 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*. 1998;101(2):487-96.
22. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*. 1995;332(22):1475-80.
23. Noone PG, Knowles MR. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res*. 2001;2(6):328-32. Review.
24. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet*. 1993;3(2):151-6.
25. Groman JD, Hefferon TW, 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*. 2004;74(1):176-9.
26. Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle FE. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet*. 1999;8(13):2339-49.
27. Clinical and functional translation of CFTR mutation database CFTR2 [Internet]. Toronto (Canada): Hospital for Sick Children; 2011 [cited 2016 Jul 12]. Available from: <http://www.cftr2.org/>
28. Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a009548.
29. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*. 1998;339(10):653-8.
30. Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet*. 1994;7(2):169-75.

31. Poolman EM, Galvani AP. Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J R Soc Interface*. 2007;4(12):91-8.
32. Romeo G, Devoto M, Galletta LJ. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum Genet*. 1989;84(1):1-5. Review.
33. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*. 1994;266(5182):107-9.
34. Högenauer C, Santa Ana CA, Porter JL, Millard M, Gelfand A, Rosenblatt RL, et al. Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet*. 2000;67(6):1422-7.
35. Lubinsky M. Hypothesis: cystic fibrosis carrier geography reflects interactions of tuberculosis and hypertension with vitamin D deficiency, altitude and temperature. Vitamin D deficiency effects and CF carrier advantage. *J Cyst Fibros*. 2012;11(1):68-70.
36. Human Genetic Programme, Chronic Diseases and Health Promotion, World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis: report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)/A/ECFS [Internet]. Genoa: WHO;c2004 [cited 2016 Jul 12]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68702/1/WHO_HGN_CF_WG_04.02.pdf
37. Lao O, Andrés AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(5):385-94.
38. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002;19(6):575-606. Review.
39. Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet*. 2002;70(1):257-64.
40. Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol*. 1997;69(3):419-25.
41. Zielenski J, Fujiwara TM, Markiewicz D, Paradis AJ, Anacleto AI, Richards B, et al. Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet*. 1993;52(3):609-15.
42. Shoshani T, Augarten A, Gazit E, Bashan N, Yahav Y, Rivlin Y, et al. Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet*. 1992;50(1):222-8.
43. Schwartz M, Anvret M, Claustres M, Eiken HG, Eiklid K, Schaedel C, et al. 394delTT: a Nordic cystic fibrosis mutation. *Hum Genet*. 1994;93(2):157-61.
44. Dörk T, Macek M Jr, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet*. 2000;106(3):259-68.
45. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014;13(4):403-9.

46. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*. 2004;6(5):387-91. Erratum in: *Genet Med*. 2005;7(4):286. *Genet Med*. 2004;6(6):548.
47. Dörk T, El-Harith EH, Stuhmann M, Macek M Jr, Egan M, Cutting GR, et al. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+1G-->A in diverse populations. *Am J Hum Genet*. 1998;63(2):656-62.
48. 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*. 2001;59(1):37-41.
49. Carles S, Desgeorges M, Goldman A, Thiart R, Guittard C, Kitazos CA, et al. First report of CFTR mutations in black cystic fibrosis patients of southern African origin. *J Med Genet*. 1996;33(9):802-4.
50. Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC): Relatório anual de 2013 [Internet]. GBEFC; 2013 [citado 2016 Jul 12]. Disponível em: http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2016/03/REBRAFC_2013.pdf
51. Faucz FR, Souza DA, Olandoski M, Raskin S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet*. 2010;55(2):71-6.
52. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira 2015 [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2015. [citado 2016 Jul 12]. [Estudos e Pesquisas. Informação Demográfica e Socioeconômica, 35]. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv95011.pdf>
53. Faucz FR, Gimenez J, Ramos MD, Pereira-Ferrari L, Estivill X, Raskin S, et al. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin Genet*. 2007;72(3):218-23.
54. Streit C, Burlamaque-Neto AC, de Abreu e Silva F, Giugliani R, Saraiva Pereira ML. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Metab*. 2003;78(4):259-64.
55. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. [Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity]. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(5):371-9. Portuguese.
56. Cabello GM, Cabello PH, Otsuki K, Gombarovits ME, Llerena JC 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*. 2005;77(1):125-35.
57. Perone C, Medeiros GS, del Castillo DM, de Aguiar MJ, Januário JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(2):134-8.
58. Moura Costa FM, Santana MA, Lemos AC, Galvão-Castro B, Acosta AX. Low frequency of the deltaAF508 mutation of the CFTR gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil. *Hum Biol*. 2007;79(3):293-7.

59. Araújo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(1):11-5.
60. Kreindler JL. Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther.* 2010;125(2):219-29. Review.
61. Berwouts S, Morris MA, Girodon E, Schwarz M, Stuhmann M, Dequeker E. Mutation nomenclature in practice: findings and recommendations from the cystic fibrosis external quality assessment scheme. *Hum Mutat.* 2011;32(11):1197-203.
62. Elliott AM, Radecki J, Moghis B, Li X, Kammesheidt A. Rapid detection of the ACMG/ACOG-recommended 23 CFTR disease-causing mutations using ion torrent semiconductor sequencing. *J Biomol Tech.* 2012;23(1):24-30.
63. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, Sharma N, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet.* 2013;45(10):1160-7.
64. van der Doef HP, Kokke FT, van der Ent CK, Houwen RH. Intestinal obstruction syndromes in cystic fibrosis: meconium ileus, distal intestinal obstruction syndrome, and constipation. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011;13(3):265-70. Review.
65. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2003;361(9370):1671-6.
66. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
67. Wetterstrand K. DNA sequencing costs: data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) [Internet]. Bethesda: NIH; 2016 [cited 2016 Jul 12]. Available from: <https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>
68. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro MA, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2013;39(3):306-16.
69. Sheridan MB, Fong P, Groman JD, Conrad C, Flume P, Diaz R, et al. Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na⁺ channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(22):3493-8.
70. Shah VS, Meyerholz DK, Tang XX, Reznikov L, Abou Alaiwa M, et al. Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. *Science.* 2016;351(6272):503-7.

Abstract

Purpose: To sequence the coding region of the CFTR gene in cystic fibrosis patients and patients with suspected CFTR related disorders and evaluate associations between the mutations found and clinical data. **Methods:** CF patients and patients with suspected atypical CF or CFTR-related disorders attending our pediatric cystic fibrosis center at Instituto da Criança from Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo were invited to enroll. Total DNA was extracted from blood samples, quantified and purified. Library preparation was performed using IonXpress Plus gDNA and Amplicon Library preparations kits (Life Technologies) and sequencing using the IonTorrent platform (Life Technologies). **Results:** One hundred and twenty-six cystic fibrosis patients and 15 patients with suspected atypical CF or CFTR-related disorders were enrolled in the study. Among the non-CF patients, one patient had one CF-causing mutation and one mutation of unknown clinical significance, one patient had one heterozygous CF-causing mutation and one patient had one heterozygous mutation of varying clinical consequence. Among CF patients we identified two CF-causing mutations in 122 patients, one heterozygous CF-causing mutation in one patient and no CF-causing mutations in three patients. The most frequent mutations were c.1521_1523delCTT (F508del), c.1624G>T (G542X) and c.2988+1G>A (3120+1G->A). **Conclusions:** Next-generation sequencing allowed us to identify CFTR mutations in 97,2% of the alleles of CF patients and showed significant differences in the prevalence of mutations between the Brazilian and the European and North American populations, as shown by the smaller frequency of the F508del mutation and higher frequency of the G542X and 3120+1G->A mutations. There were also marked differences between the frequency of mutation 3120+1G->A in our patients and data from the Brazilian CF Registry, probably due to the diagnostic methods used.

Bibliografia consultada

Clark DP, Pazdernik NJ. Molecular biology. 2nd ed. Elsevier; 2012.

Rother ET, Braga ME. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a ed. rev. e ampl. São Paulo; 2005.