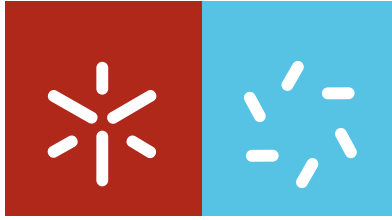


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marisa Raquel Costa Teixeira

**Frequência da mutação F508del no gene
CFTR na população portuguesa**

Março de 2007



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marisa Raquel Costa Teixeira

**Frequência da mutação F508del no gene
CFTR na população portuguesa**

Tese de Mestrado
Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora Maria da Purificação Tavares

Março de 2007

Declaração

NOME:

Marisa Raquel Costa Teixeira

ENDEREÇO ELECTRÓNICO: marisa.tx@gmail.com

TELEFONE: 917766138 / 256943258

NÚMERO DO BILHETE DE IDENTIDADE: 11990547

TÍTULO DA TESE: Frequência da mutação F508del no gene *CFTR* na população portuguesa

ORIENTADOR:

Professora Doutora Maria da Purificação Tavares

TESE DE MESTRADO EM:

Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura:

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi conseguida com a ajuda, companheirismo, generosidade e boa vontade de muitos, por isso não queria deixar passar a oportunidade de agradecer a todos os que de algum modo contribuíram para a sua concretização.

À Professora Doutora Purificação Tavares, gostaria de agradecer toda a orientação e oportunidade de poder pertencer ao seu grupo de trabalho, possibilitando assim a execução deste estudo.

Ao Doutor Sebastian Beck, meu co-orientador, queria agradecer o apoio e orientação durante o meu trabalho. Desde o início disponibilizou o seu conhecimento, espírito crítico e amizade, estimulando a minha capacidade e método de trabalho.

A todos os Professores do Mestrado, pela contribuição para a minha formação académica.

Aos meus Colegas de Mestrado, pelas trocas de experiências, que me enriqueceram como profissional e como pessoa.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, do CGC Centro de Genética Clínica, muito obrigada pela ajuda e apoio.

Aos meus Amigos, pelo apoio e incentivo.

Aos meus Pais e Irmã, pela paciência, carinho e apoio que demonstraram ao longo destes anos.

Ao Rui, pelo apoio e amizade que muito prezo e cuja presença foi muito importante ao longo destes anos.

Resumo

Frequência da mutação F508del no gene *CFTR* na população portuguesa

A Fibrose Quística é a doença genética autossómica recessiva letal mais frequente na população caucasiana. Como tal, tem sido alvo de intensa investigação ao longo dos anos.

Com os seus efeitos complexos nas membranas celulares, envolvimento de múltiplos órgãos e o comportamento clínico imprevisível, a Fibrose Quística provou ser um desafio para a moderna medicina molecular.

Em Portugal, como na maior parte dos países, a mutação mais frequente no gene *CFTR* associado à Fibrose Quística, é a mutação F508del. No entanto, não existe neste país qualquer estudo da frequência deste alelo baseado no rastreio de um grande número de pessoas saudáveis e seleccionadas aleatoriamente.

Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias para o rastreio da mutação F508del em 500 indivíduos oriundos de várias regiões geográficas de Portugal. Através da prevalência deste alelo na população portuguesa, foi possível calcular uma estimativa da incidência da Fibrose Quística no nosso país. Surpreendentemente, e com base nos nossos dados, a incidência desta doença em Portugal encontra-se dentro da média europeia.

Estes resultados deviam ter consequências práticas, como por exemplo no cálculo do risco nas consultas de aconselhamento genético, bem como no cálculo da relação custo/benefício dos programas de rastreio neonatal a serem implementados em Portugal.

Abstract

Frequency of F508del mutation in the *CFTR* gene in the portuguese population

Cystic Fibrosis is the most common severe autosomal recessive disorder in the caucasian population. Therefore, it has been a target of intense investigation along the years.

With its complex effects in the cellular membranes, involvement of multiple organs and the clinical unpredictable behaviour, Cystic Fibrosis proved to be a challenge for the modern molecular medicine.

In Portugal, as in most countries, the most frequent disease causing mutation in the *CFTR* gene is F508del. However, no population based study exists for the prevalence of this allele in the portuguese population.

In this work, two methods were used to screen the F508del mutation in 500 healthy individuals originated from several geographical regions of Portugal. Through the prevalence of this allele in the portuguese population, it was possible to calculate a prediction of the incidence of Cystic Fibrosis in our country. Surprisingly, based on our data, the incidence of Cystic Fibrosis in Portugal should be the same as the average in Europe.

This result should have a practical application, for instance in risk calculation in genetic counselling as well as in calculation of benefit/cost-ratio of newborn screening programs to be implemented in Portugal.

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	1
I.I – Perspectiva Histórica	2
I.II – Manifestações clínicas	3
I.III – Genética FQ: do gene à proteína.....	6
I.III.I – Descoberta do gene	6
I.III.II – Estrutura do gene <i>CFTR</i>	7
I.IV – A proteína CFTR	8
I.IV.I – Estrutura e função	8
I.IV.II – Classes de mutações e defeitos associados ao canal de cloreto.....	10
I.V – A FQ no mundo	15
I.VI – Espectro mutacional europeu	16
I.VII – Diagnóstico.....	17
I.VII.I – Análise dos electrólitos do suor.....	17
I.VII.II – Análise genética	20
I.VII.III – Testes auxiliares	20
I.VIII – Tratamento	21
I.IX – Rastreio e diagnóstico pré-natal	22
I.X – Rastreio neonatal	24
II – OBJECTIVOS.....	28
III – MATERIAL E MÉTODOS	30
III.I – Amostras.....	31
III.II – Métodos	33
III.II.I Extracção de DNA	33
III.II.II – Bi-PASA e gel de agarose	33
III.II.III – PCR fluorescente e GeneScan (ABI 310).....	36
III.III – Cálculos	138
IV – RESULTADOS.....	40
V – DISCUSSÃO.....	44
VI – CONCLUSÃO	48
VII- BIBLIOGRAFIA.....	50
VIII- ANEXOS.....	57

ÍNDICE de FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático dos eventos patogénicos que conduzem à infecção crónica por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas vias respiratórias de pacientes com FQ.....	5
Figura 2 – Estrutura simétrica do canal CFTR.....	10
Figura 3 – Representação esquemática das diferentes classes de mutações do gene <i>CFTR</i>	11
Figura 4 – Número total de PCRs necessárias e número ideal de amostras a incluir nas <i>pools</i> tendo em conta a taxa de portadores F508del.....	32
Figura 5 – Esquema representativo do princípio do método Bi-PASA.....	34
Figura 6 – Exemplo dos resultados da genotipagem F508del pelo método Bi-PASA.....	41
Figura 7 – Exemplo dos resultados da genotipagem F508del pelo método da PCR fluorescente e Gene Scan.....	42

ÍNDICE de TABELAS

Tabela 1 – Patogénese e manifestações clínicas associadas à Fibrose Quística.....	4
Tabela 2 – Propriedades do canal CFTR.....	8
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados no Bi-PASA para F508del.....	35
Tabela 4 – Volume de reagentes por cada PCR Bi-PASA.....	36
Tabela 5 – <i>Primers</i> utilizados na PCR fluorescente para F508del.....	37
Tabela 6 – Volume de reagentes por cada PCR fluorescente.....	37
Tabela 7 – Distribuição da mutação F508del nas diferentes regiões geográficas.....	43
Tabela 8 – Prevalência de portadores da mutação F508del e estimativa da incidência da FQ na população portuguesa.....	43

Abreviaturas e Siglas

- ABC** – *ATP binding cassette*
- ATP** – Adenosina trifosfato
- Bi-PASA** – *Bidirectional PCR amplification of specific alleles*
- CaCC** – Canal de cloreto ativado pelo cálcio
- cAMP** – Adenosina monofosfato cíclico
- CBAVD** – Ausência congênita bilateral do canal deferente
- cDNA** – DNA complementar
- CFMDB** – Cystic fibrosis mutation database
- CFTR** – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- CHIP** – *Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- ENaC** – *Epithelial amiloride sensitive Na⁺ channel*
- FQ** – Fibrose quística
- Hsc70** – *Heat shock cognate protein 70*
- IRT** – Tripsina imuno-reativa
- mRNA** – RNA mensageiro
- NBD** – Domínio de ligação a nucleótidos
- OMIM** – *Online mendelian inheritance in man*
- PASA** – *PCR amplification of specific alleles*
- PCR** – *Polimerase chain reaction*
- PKA** – Proteína cinase A
- POP** – *Performance optimized polymers*
- Primer** – Sequência nucleotídica iniciadora do PCR
- R** – Domínio regulatório citoplasmático
- RE** – Retículo endoplasmático
- RNA** – Ácido ribonucleico
- TMD** – Domínio transmembranar
- 4-PBA** – Ácido 4-fenilbutírico

I – INTRODUÇÃO

I.I – Perspectiva Histórica

Em 1936 Guido Fanconi descreveu pela primeira vez os sintomas da “mucoviscidose do pâncreas”, baseado no exame patológico de duas crianças que morreram devido a esta doença (Fanconi *et al.*, 1936). A designação de mucoviscidose (ainda hoje utilizada) advém do facto dos ductos das glândulas mucosas (exócrinas) ao longo do corpo serem obstruídos por um muco viscoso. Em 1938 Dorothy H. Andersen definiu e caracterizou a doença a que chamou Fibrose Quística do Pâncreas devido a alterações microscópicas precoces do tecido pancreático (Andersen, 1938). A doença tornou-se conhecida como uma exocrinopatia generalizada pelo facto de muitas glândulas exócrinas serem afectadas. Até esta altura, o muco secretado pelas glândulas era alvo de estudo no sentido de se descobrir qual o defeito básico da doença (Davis, 2006). Em 1948, uma onda de calor em Nova Iorque ajudou o jovem pediatra Paul di Sant` Agnese a descobrir que os pacientes com Fibrose Quística (FQ) perdiam excesso de sal no seu suor. Esta descoberta veio pôr de parte a ideia de que o defeito básico subjacente a esta patologia estaria ligado ao muco, modificações do muco ou secreções macromoleculares (Mishra *et al.*, 2005). Em 1983 Paul Quinton descobriu que o transporte de cloreto da cavidade ou lúmen das glândulas sudoríparas através do epitélio que delimita as glândulas, não ocorria de modo eficaz nos doentes com FQ. Numa linha paralela de investigação, Knowles, Boucher e seus colaboradores descobriram que o aumento da reabsorção de sódio nas vias respiratórias era uma característica regular nos indivíduos com FQ (Welsh and Smith, 1995). As bases genéticas da doença foram confirmadas pela descoberta do gene em 1989. Esta descoberta permitiu avanços consideráveis na área de investigação da doença (Davis, 2006).

I.II – Manifestações clínicas

A Fibrose Quística (OMIM #219700) é definida como uma doença monogénica autossómica recessiva que se apresenta como uma doença multissistémica (Collen, 1991). É a doença autossómica recessiva letal mais comum na população caucasiana, sendo uma importante causa de morte na criança, adolescente e adulto jovem nesta população. A frequência de portadores de um gene mutado na população europeia é de 1 em cada 25 a 30 pessoas sem predomínio de sexo. Apresenta uma incidência média, nesta população, de 1 em 2000 até 1 em 3000 nascimentos com variações significativas de acordo com o grupo étnico e com a localização geográfica (Bobadilla *et al.*, 2002).

A doença é provocada por mutações no gene **CFTR** (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) que codifica um canal de cloreto (Aris *et al.*, 2005; Beauchamp and Lands, 2005; Davis, 2006)

A FQ é uma doença altamente variável. Os pacientes são diagnosticados com diferentes modos de apresentação da doença, desde o nascimento até a fase adulta, com considerável variação na severidade e na taxa de progressão. A disfunção característica da FQ resulta da produção anormal de um muco viscoso pelas glândulas exócrinas em vários órgãos, incluindo o tracto respiratório, pâncreas exócrino, intestino, vasos deferentes e sistema hepatobiliar. A mesma disfunção causa um défice na reabsorção do cloreto nos ductos das glândulas sudoríparas exócrinas o que provoca a elevação da concentração de NaCl no suor destes doentes. Consequentemente resulta numa doença multissistémica caracterizada por obstrução das vias respiratórias, insuficiência pancreática, cirrose biliar multifocal, problemas de motilidade intestinal, má nutrição, infertilidade masculina e perda de electrólitos no suor (Mishra *et al.*, 2005). O espectro geral das características fenotípicas da FQ está sumariado na tabela 1.

Tabela1 – Patogénese e manifestações clínicas associadas à Fibrose Quística.

Órgão	Patogénese	Manifestações clínicas (frequência)	Idade habitual de início
Pulmão	Inflamação/Infecção Obstrução	Bronquiectasias (≈100%) Bronquite (≈100%) Pneumonia (≈100%) Pneumotórax (ocasional) Hemoptises (ocasional)	Em todas as idades Em todas as idades Em todas as idades 2ª infância 2ª infância
Vias aéreas superiores	Inflamação/Infecção/Obstrução	Sinusite (≈ 50%) Pólipos Nasais (≈ 15%)	Em todas as idades Em todas as idades
Intestino	Obstrução	Íleo meconal (10-25%) Equivalente a Íleo meconal (comum) Invaginação (ocasional) Edema hipoalbuminemia (ocasional) Prolapso rectal (ocasional)	Nascimento 2ª infância Em todas as idades Em todas as idades 1ª infância
Pâncreas	Obstrução/Fibrose	Malabsorção (80-90%) Diabetes (1-5%)	Geralmente lactente > adolescência
Fígado	Obstrução/Fibrose	“Cirrose subclínica” (25-50%) Icterícia neonatal (ocasional)	Em todas as idades Lactente
Vesícula e Vias biliares	Obstrução	Microvesícula Biliar (20%) Obstrução do Cístico (20%) Colestase extrahepática (desconhecida)	Em todas as idades Em todas as idades Em todas as idades
Órgãos Reprodutivos	Obliteração do canal deferente Secreções vaginais espessas Hidrocelo/Hérnea	Esterilidade/azoospermia (97%) Diminuição da fertilidade (comum) (ocasional)	Nascimento 2ª infância Em todas as idades
Glândulas Sudoríparas	Alterações dos electrólitos	Perda de sal (≈100%) Prostração pelo calor (≈100%)	Em todas as idades Em todas as idades
Glândulas Salivares	Alterações dos electrólitos	(≈100%)	Em todas as idades
Retina	Hipóxia/Retinopatia exudativa	Distúrbios visuais	Em todas as idades
Ouvidos	Obstrução ouvido médio- faringe	Perda auditiva de condução	Em todas as idades
Coração	Hipóxia, Anastomose broncopulmonar	Cor Pulmonale Fibrose	Em todas as idades Em todas as idades
Ossos e extremidades		Osteoartropatia hipertrófica “Clubbing”	Em todas as idades Em todas as idades

Adaptado de Fonseca e Cernadas, 1999.

Embora a FQ seja uma doença multissistémica, as complicações pulmonares são a maior causa de morbidade e mortalidade nesta patologia (mais de 90% dos pacientes morrem devido a esta causa) (Mishra *et al.*, 2005).

Num epitélio respiratório normal existe uma fina camada de líquido (líquido periciliar) que preenche o espaço periciliar. A presença desta camada pouco viscosa de líquido facilita o movimento de limpeza mucociliar (Boucher, 2004). Em indivíduos com FQ o transporte anormal de electrólitos a nível epitelial, resulta numa alteração do fluido superficial das vias respiratórias; a redução isotónica do volume do líquido periciliar impede o movimento dos cílios das células e consequentemente uma dificuldade na remoção do muco de revestimento. Este processo provoca uma obstrução das pequenas vias e a infecção das mesmas (Lee *et al.*, 2005) (Figura 1). Inicialmente as vias respiratórias dos indivíduos com FQ são infectadas por um espectro limitado de bactérias (as espécies mais comum são *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*), com a progressão da doença, ocorre a colonização crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. As infecções recorrentes e inflamação conduzem à hipertrofia das glândulas da submucosa, secreção excessiva de muco e dano das vias respiratórias, provocando broquioloectasias, bronquiectasias e finalmente o desenvolvimento de quistos (Li *et al.*, 1993). O tecido respiratório danificado é substituído por fibrose. Num estado mais avançado, pode ocorrer morte por hipóxia, falência respiratória ou complicações cardíacas (Kahre, 2004).

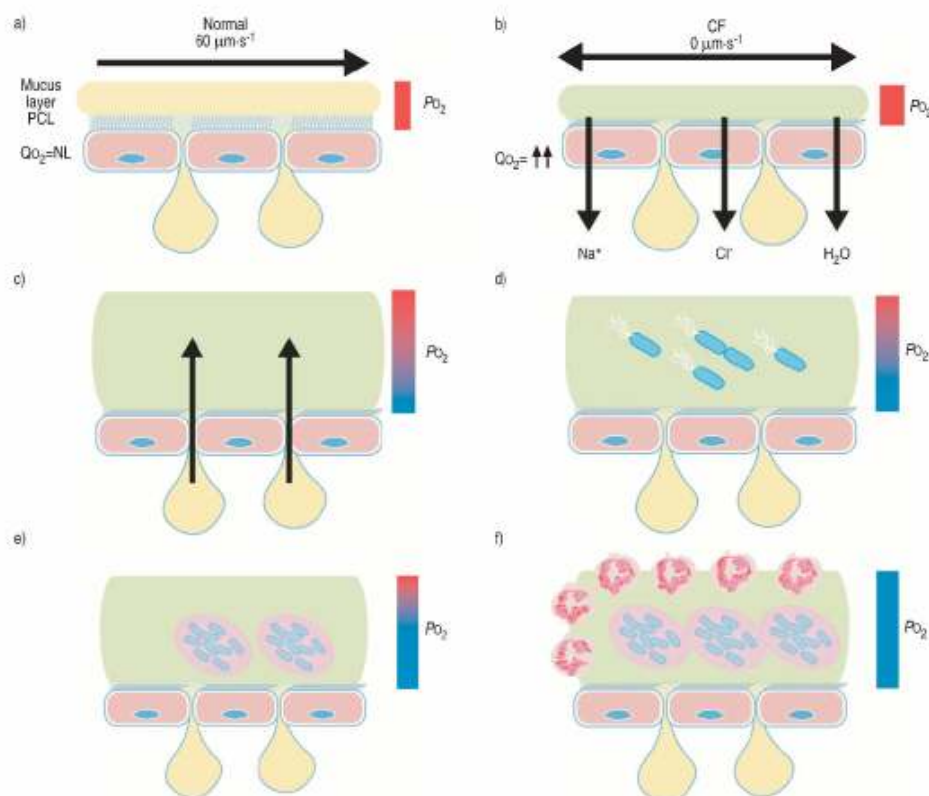


Figura 1 – Modelo esquemático dos eventos patogénicos que conduzem à infecção crónica por *Pseudomonas aeruginosa* nas vias respiratórias de pacientes com FQ. a) Epitélio respiratório normal. A presença de uma camada pouco viscosa de líquido periciliar (PCL) facilita o movimento de limpeza mucociliar. Um consumo normal de O₂ epitelial (Q_{O2}) não produz gradientes de oxigénio na camada de muco epitelial. b-f) Epitélio respiratório FQ. b) Diminuição da remoção do muco de revestimento (vector bidirecional). O elevado consumo de O₂ gera gradientes hipóxidos na camada de muco viscoso. d) Bactérias *P. aeruginosa* depositadas na superfície do muco penetram nas zonas hipóxidas da camada de muco. e) *P. aeruginosa* adapta-se ao nicho hipóxido e forma macro colónias. f) As macro colónias resistem às defesas secundárias, incluindo neutrófilos, dando origem a períodos da infecção crónica. (Boucher *et al.*, 2004).

I.III – Genética FQ: do gene à proteína

I.III.I – Descoberta do gene

Enquanto decorriam vários estudos paralelos de investigação da doença, muitos cientistas tentavam encontrar o gene responsável pela FQ. Este esforço culminou em 1989 (Rommens *et al.*, 1989), quando um grupo de colaboradores liderado por Lap-Chee Tsui e John R. Riordan do Hospital pediátrico de Toronto e por Francis S. Collins da Universidade de Michigan anunciaram que tinham isolado o gene. Técnicas como “*Chromosome Walking e Jumping*” bem como hibridização com DNA complementar foram usadas para isolar o gene. Um fragmento de DNA genómico de 4,3-kb contendo ilhas CpG foi usado para fazer o “*screen*” de uma biblioteca de cDNA derivada de mRNA do epitélio de glândulas sudoríparas. Este clone detectou um fragmento de mRNA com cerca de 6,5 kb em muitos tecidos epiteliais, incluindo pâncreas, pólipos nasais, pulmões, cólon, glândulas sudoríparas e fígado, não sendo encontrado em tecidos não afectados pela FQ. Foi identificado a partir da sequência de cDNA um produto proteico com 1480 aminoácidos (Rommens *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

Embora o gene da doença granulomatosa crónica tenha sido identificado muito cedo por clonagem posicional, o gene da FQ foi o primeiro gene, com função desconhecida, a ser descoberto através desta técnica.

Enquanto tentavam encontrar o gene, a equipa também identificou uma sequência anormal de DNA que ocorria em cerca de 70% dos casos de FQ. Esta sequência corresponde à sequência mutada F508del, que consiste na deleção de 3 bases resultando na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína (Rommens *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

O gene descoberto obedece a três critérios chave que indicam ser o gene responsável

pela FQ: 1) foi isolado da região candidata do cromossoma 7 (7q31.2); 2) o seu padrão de expressão é consistente com os tecidos afectados na FQ; 3) a mutação encontrada neste gene (F508del) ocorre em homozigotia apenas em cromossomas de indivíduos com FQ (Davis *et al.*, 1996). A sequência de aminoácidos prevista sugeria que a proteína é um transportador activo similar às proteínas de tráfico da família das ATPases e evidências fisiológicas indicavam que regulava a condução de iões através das células epiteliais. Tendo em conta estes aspectos, foi adoptado o nome Regulador da Condutância Transmembranar para a Fibrose Quística (“*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*”) – **CFTR** (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

Com a descoberta do gene foi possível um diagnóstico mais refinado da doença, o conhecimento mais profundo dos problemas clínicos e a definição do impacto da deficiência total ou parcial do produto proteico. Foi possível definir a natureza das mutações no gene *CFTR* bem como a pesquisa de medicamentos para as corrigir. O gene tornou-se por si só um potencial agente terapêutico. É difícil estimar a importância da descoberta do gene associado à FQ (Davis, 2006).

I.III.II – Estrutura do gene *CFTR*

O gene *CFTR* (OMIM * 602421) tem cerca de 250 kb e está localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31.2) (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

Inicialmente pensava-se que era constituído por 24 exões (Beauchamp and Lands, 2005). A sequenciação deste gene revelou posteriormente que três dos exões (exão 6, 14 e 17) correspondiam cada um a 2 exões (6a e 6b, 14a e 14b, 17a e 17b), o que deu origem à actual versão de que o gene é constituído por 27 exões (Guggino and Stanton, 2006).

Estudos da região promotora do gene revelaram a ausência de TATA box, uma zona de reconhecimento pela RNA polimerase, característica dos genes que exibem expressão em tecidos específicos. A região promotora é rica em citosina e guanina (“ilhas CpG”), uma característica mais comum nos genes com expressão ubíqua, tal como nos chamados genes “housekeeping” (Yoshimura *et al.*, 1991). Para além disso, esta região promotora possui inúmeras sequências consenso específicas para ligação de uma variedade de factores de transcrição (Davis *et al.*, 1996).

Estudos da expressão do *CFTR* em linhas celulares indicam que a actividade de transcrição pode ser aumentada pela exposição prolongada a elevadas quantidades de cAMP, sugerindo a presença de elementos de resposta ao cAMP na região promotora do gene (Breuer

et al., 1992).

Em adição ao complexo processo regulatório de transcrição do gene *CFTR*, o transcrito primário é processado de diferentes formas, dando origem a variantes de *splicing* alternativo. Foram detectadas várias formas de *splicing* alternativo (ex. ausência dos exões 4,5,9,12 ou inexistência da segunda metade do gene) (Devuyst and Guggino, 2002; Vankeerberghen *et al.*, 2002). No entanto, muitas destas variantes alteram a grelha de leitura dos transcritos dando origem a proteínas não funcionais (Davis *et al.*, 1996).

O conhecimento detalhado da estrutura do canal CFTR é a chave para perceber a patologia molecular de todas as mutações associadas à doença.

I.IV – A proteína CFTR

I.IV.I – Estrutura e função

Quinton (Quinton, 1986), Knowles e seus colaboradores (Knowles *et al.* 1981; Knowles *et al.* 1983), trabalhando respectivamente com células das glândulas sudoríparas e células das vias respiratórias determinaram que o principal defeito fisiológico na FQ é a reduzida condução de cloreto na superfície apical das células epiteliais. Após a descoberta do gene em 1989, a proteína foi purificada e demonstrou-se que era um canal de cloreto (Bear *et al.*, 1992). O gene *CFTR* normal, quando transfectado para células de doentes com FQ restabelece a condução de cloreto mediada por cAMP nestas células (Rich *et al.*, 1990; Drumm *et al.*, 1990). Em estudos de reconstrução do canal a partir da proteína purificada, foi observada a condução de cloreto regulada pela proteína cinase A (Bear *et al.*, 1992; Tilly *et al.*, 1992). Todas estas observações confirmam que CFTR é um canal de cloreto, cuja regulação é realizada ao nível da fosforilação pela proteína cinase A (PKA). As propriedades deste canal estão sumariadas na tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades do canal CFTR.

Condução	Baixa (7-10pS)
Relação corrente/voltagem	Linear
Inibidores	Ácido difenilamina-2-carboxílico (DPC) Glibenclamida
Activação	PKA ATP (intracelular)
Selectividade iónica	Br ⁻ > Cl ⁻ > I ⁻ > F ⁻

Adaptado de Okay *et al.*, 2005.

O gene *CFTR* codifica uma glicoproteína com 1480 aminoácidos com massa molecular de 168 kDa que se encontra na membrana apical das linhas celulares epiteliais das vias respiratórias, árvore biliar, intestinos, vasos deferentes, ductos sudoríparos e ductos pancreáticos (Riordan *et al.*, 1989). A proteína CFTR pertence à Superfamília de Transportadores *ATP binding cassette* (ABC) (Guggino and Stanton, 2006; Amaral, 2004). Esta Superfamília de Transportadores é responsável por um conjunto de funções vitais, como o transporte de nutrientes, libertação de toxinas e a comunicação intercelular em eucariontes, eubactéria e arqueobactéria. São responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de solutos através das membranas biológicas, incluindo açúcares, aminoácidos, aniões, cromóforos, drogas, péptidos, proteínas e lípidos (Dorwart *et al.*, 2004).

A organização dos transportadores ABC microbianos e a sua arquitectura nos eucariontes sugere que a unidade funcional dos transportadores consiste em dois domínios de ligação a nucleótidos (NBDs) (ou cassetes) no citoplasma e dois domínios transmembranares (TMDs), que possuem vários segmentos (Dorwart *et al.*, 2004).

O canal CFTR (também chamado de ABCC7) é composto por cinco domínios: dois TMDs (cada um composto por seis subunidades), dois NBDs e um domínio regulatório citoplasmático (R) (que existe apenas no canal CFTR e não nos outros transportadores ABC), o qual é activado por fosforilação pela PKA (Figura 2). Os TMDs contribuem para a formação do poro do canal de cloreto e mutações em resíduos específicos no TMD₁ alteram a selectividade aniónica do canal (Riordan *et al.*, 1989; Mishra *et al.*, 2005). Os NBDs do canal CFTR possuem sequências altamente conservadas, chamadas *Walker A*, *Walker B* e *LSGGQ*. Estas sequências são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP (que fornece a energia necessária para a actividade do canal) e outras moléculas nucleotídicas, envolvidas na regulação do canal de cloreto. O domínio regulatório modula a actividade do canal CFTR e pode ter efeitos de activação ou de inibição (Mishra *et al.*, 2005). Os segmentos transmembranares possuem 6 *loops* intracelulares e 4 extracelulares. Foi proposto que 77% dos resíduos da proteína estão no citoplasma, 19% nos segmentos transmembranares e 4% nos *loops* extracelulares (Riordan *et al.*, 1989; Sheppard and Welsh, 1999).

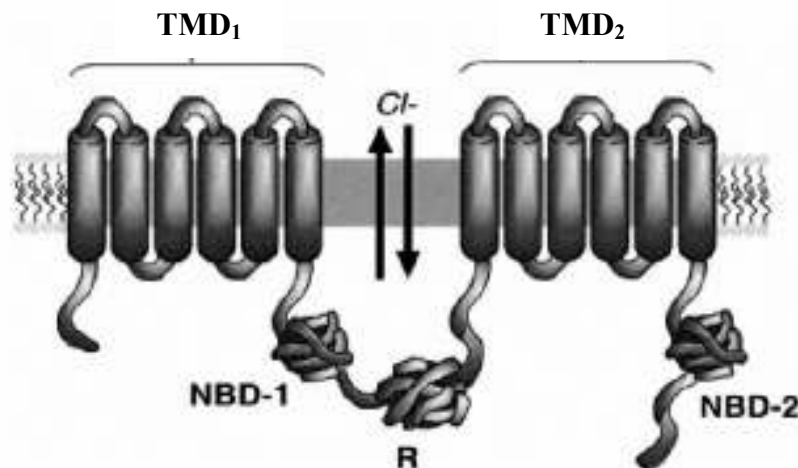


Figura 2 – Estrutura simétrica do canal CFTR. Dois domínios transmembranares (TMD-1/2) com seis segmentos transmembranares cada um, dois domínios de ligação a nucleótidos (NBD1/2) e um domínio hidrofílico R intracelular (Mishra *et al.* 2005).

São muitas as cinases que podem activar o canal de cloreto CFTR, mas apenas a activação pela PKA está descrita em detalhe. O domínio R é fosforilado pela PKA dependente de cAMP. Esta fosforilação permite a ligação do ATP ao NBD₁. Quando o ATP é hidrolisado pelo NBD₁ o canal abre e os aniões passam de acordo com o gradiente electroquímico, através do poro formado pelos domínios transmembranares (TMDs). Quando o domínio R está completamente fosforilado, o NBD₂ pode ligar ATP. Esta ligação permite a estabilização do canal aberto. Quando o ATP é hidrolisado pelo NBD₂ e o ADP+Pi é libertado de ambos os NBDs o canal fechará outra vez (Luo *et al.*, 1998).

I.IV.II – Classes de mutações e defeitos associados ao canal de cloreto

A nível funcional, os efeitos das mutações na actividade do canal de cloreto são consistentes com a natureza recessiva da doença: mutações resultam na redução da função, quantitativa e/ou qualitativamente. Estas mutações podem alterar a função do canal quer indirectamente, interferindo com a formação da estrutura tridimensional nativa do canal, ou mais directamente, interferindo com os processos de activação, abertura e condução (Davis *et al.*, 1996).

Desde a identificação do gene e da mutação mais frequente (F508del) responsáveis pela FQ, foram descritas mais de 1500 mutações e variações na sequência (polimorfismos) de DNA do gene *CFTR* (CFMDB: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). Existem regiões no canal CFTR onde as mutações são mais comuns, como os NBDs e o domínio regulatório (R)

(Rowntree and Harris, 2003).

As mutações no gene *CFTR* foram inicialmente subdivididas por Welsh e Smith (Welsh and Smith, 1993) em 4 classes. Esta divisão é extremamente simples e básica. No entanto, devido à existência de fenótipos relacionados com FQ associados a mutações particulares no *CFTR* e a propriedades regulatórias do canal, foi feita uma extensão do número de classes para 5 e mais recentemente para 6 (Figura 3) (Vankeerberghen *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2005). No entanto, estas classes não são mutuamente exclusivas e, mutações específicas podem ter características de mais do que uma classe.

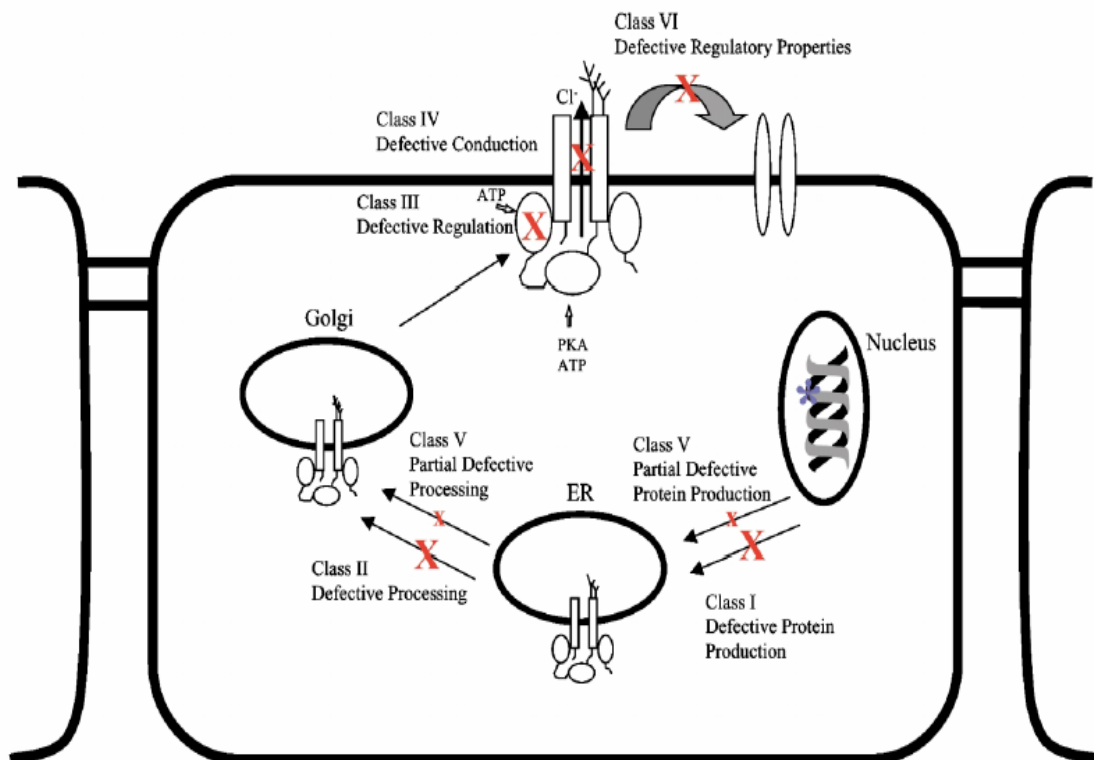


Figura 3 – Representação esquemática das diferentes classes de mutações do gene *CFTR* (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

Classe I

Esta classe de mutações inclui as mutações que dão origem aos fenótipos mais severos na FQ, resultando na ausência de síntese da proteína. Dão origem à formação de sinais de terminação prematuros. Como consequência, são formados transcritos instáveis e/ou proteínas aberrantes possuindo deleções ou novas seqüências de aminoácidos. Estas proteínas são

frequentemente instáveis e supõe-se que sejam degradadas rapidamente ou que desempenhem uma função de pequena importância. A mutação da classe I mais frequente é G542X (substituição de uma glicina por um codão STOP na posição 542) (Rowntree and Harris, 2003).

Os antibióticos aminoglicosídeos podem suprimir os codões de terminação prematuros. Estas substâncias quebram a fidelidade de tradução, permitindo a incorporação de um aminoácido e a continuação da tradução até à terminação normal do transcrito (Mishra *et al.*, 2005). A susceptibilidade de supressão pelos aminoglicosídeos depende do codão stop e da sequência à volta deste. Os antibióticos aminoglicosídeos ligam-se a um sítio específico no RNA ribossómico quebrando o reconhecimento codão-anticodão pela extremidade aminoacil do RNA de transferência. Isto provoca erros de leitura do código do RNA, permitindo a inserção de aminoácidos alternativos no local do codão mutado. Estas substituições não são completamente eficazes, levando apenas à restauração de alguma fracção dos níveis normais dos transcritos completos (Kerem, 2005).

Classe II

Após a tradução, que ocorre no ribossoma, a proteína CFTR sofre uma série de processos de glicosilação e modulação no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, tornando possível o movimento das proteínas CFTR para a membrana das células apicais.

A maioria das mutações descritas como responsáveis pela FQ incluem-se nesta classe (incluindo a mutação F508del). Mutações nesta classe encontram-se associadas a defeitos no processamento das proteínas dando origem a proteínas imaturas (Fonseca e Cernadas, 1999). Estas proteínas CFTR anormais são retidas no RE, sendo posteriormente ubiquitiladas e degradadas pelo proteossoma 26S existente no citosol. Como consequência, estas proteínas mutantes não existirão, ou excepcionalmente aparecerão na superfície celular. A quantidade de proteína mutada que atinge a membrana celular é específica do tecido. Estas diferenças específicas são explicadas pelos diferentes níveis da proteína CHIP (*carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*) que interacciona com a chaperone Hsc70 (*Heat shock cognate protein 70*), conduzindo as proteínas CFTR para a via de ubiquitilação no proteossoma (Amaral, 2004).

Estudos *in vitro* utilizando a proteína CFTR F508del demonstraram que este polipeptídeo mutante pode funcionar como um canal de cloreto dependente de cAMP se for permitido que este atinja a membrana celular, sugerindo que, se forem criadas as condições que ajudem a saída da proteína mutada do RE e esta atinja a superfície celular, é possível corrigir parcialmente o defeito FQ. O resíduo 508 está localizado na superfície do NBD1, próximo da interface de interacção com o TMD. Esta localização na interface NBD-TMD é consistente com a disfunção

provocada pela mutação F508del, em que não existe um impacto significativo na estabilidade do domínio isolado, mas sim uma destabilização da estrutura CFTR intacta (Dorwart *et al.*, 2004).

Foram vários os estudos que se desenvolveram no sentido de descobrir substâncias capazes de atenuar *in vivo* estes defeitos de processamento proteico. O ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) tem efeito no mutante CFTR *in vivo*, permitindo que este saia do RE, seja glicosilado no Golgi e atinja a membrana plasmática, onde possui alguma actividade intrínseca. Em condições normais, existe uma associação do mutante CFTR com a chaperone Hsc70, provocando um aumento da sinalização para a degradação da proteína defeituosa. 4-PBA pode actuar ao nível da regulação da Hsc70, interrompendo o processo de degradação. Um mecanismo pelo qual 4-PBA promove o tráfico da proteína CFTR mutada é através da degradação do mRNA da chaperone Hsc70, consequentemente a diminuição do complexo Hsc70-CFTR. Para além disso, a regulação da chaperone Hsp70 pelo 4-PBA resulta num aumento da maturação da proteína CFTR (Kerem, 2005).

Classe III

As mutações pertencentes a esta classe produzem uma proteína CFTR que é processada no citoplasma e transportada para a membrana das células apicais, no entanto, é resistente à fosforilação ou ligação do ATP (Kerem, 2005). Até à data, as mutações descritas nesta classe foram localizadas na região NBD. Como o ATP intracelular regula a abertura do canal CFTR através de interacções directas com o NBD, mutações neste domínio podem alterar a função do canal. O canal CFTR também é regulado pela fosforilação do domínio regulatório, no entanto, mutações neste domínio são mais raras (Kelley *et al.*, 1995). Um exemplo de uma mutação da classe III é G551D (alteração de uma glicina para ácido aspártico no codão 551).

Foram encontrados muitos compostos que activam directamente a proteína CFTR normal e a forma mutante. Entre estes, os mais importantes são as alquilxantinas, como 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPX) e genisteína (Anderson and Roomans, 2000). O flavenóide genisteína é um potente activador do CFTR e pode resolver o problema de ligação do ATP ao NBD, provocado pela mutação G551D. Dados mais recentes indicaram que a explicação mais provável para o efeito de activação da genisteína é através da sua ligação directa ao NBD do CFTR. A genisteína não abre directamente o canal CFTR e necessita de ATP e da fosforilação pela PKA. Este flavenóide restaura a actividade do canal G551D-CFTR dependente de cAMP *in vitro* e *in vivo* (Illek *et al.*, 1995). Para além disso, a genisteína estimula o canal F508del-CFTR quando este já se encontra na membrana celular. Por estas razões a genisteína é considerada um activador e pode ser usada para aumentar a condução de cloreto nos canais mutados,

quando já se encontram na membrana celular.

Classe IV

A quarta classe de mutações afecta os aminoácidos localizados no poro do canal, dando origem a um canal CFTR com propriedades de condução deficientes. Esta classe de mutações está, na maioria dos casos, associada a fenótipos clínicos moderados (Sheppard *et al.*, 1993). Alguns exemplos incluem mutações nas quais a arginina é substituída pela histidina no resíduo 117 (R117H), triptofano na posição 334 (R334W), ou prolina no 347 (R347 P). Quando estas proteínas mutadas são expressas em células epiteliais heterólogas, todas são processadas correctamente, estão presentes na membrana apical, no entanto geram uma condução reduzida. Isto deve-se a uma reduzida taxa de fluxo iónico através do canal aberto. Para além disso, e principalmente para a mutação R117H, a quantidade de tempo que o canal está aberto é também reduzido (Sheppard *et al.*, 1993).

Classe V

Este grupo inclui mutações *missense* (ex. A455E-substituição de um ácido glutâmico por uma alanina) e mutações que afectam locais de *splicing* (ex. a sequência repetitiva TG e politimidinas no intrão 8 que regulam o *splicing* do exão 9 e 849+10kbC-> T) (Schultz *et al.*, 1999; Hwang and Sheppard, 1999). Estas mutações produzem uma reduzida quantidade do transcrito CFTR e baixos níveis de proteínas funcionais que são transportadas para a membrana celular. Como nestes casos é sintetizada uma pequena quantidade de transcritos mRNA completos, é de esperar que o fenótipo seja menos severo (Kerem, 2005). Recentemente, Nissim-Rafinia e seus colaboradores demonstraram que um aumento do nível de RNA com *splicing* normal de um alelo CFTR com a mutação 849+10kbC-> T, activou o canal CFTR e restaurou a sua função (Nissim-Rafinia *et al.*, 2004). Este resultado foi obtido pela sobreexpressão de factores de *splicing*, que promovem o avanço de 84-bp no exão, aumentando o nível de transcritos CFTR completos. O mesmo efeito foi obtido pela administração de butirato de sódio (NaBu), um inibidor da histona diacetilase, previamente demonstrado que regula a expressão de factores de *splicing* (Brichta *et al.*, 2003). Este resultado explica a relação entre o nível de transcritos CFTR com *splicing* correcto e a severidade da doença e fornece as bases requeridas para o desenvolvimento de investigações terapêuticas para pacientes que possuam mutações de *splicing* na FQ e noutras doenças (Kerem, 2005).

Classe VI

As mutações nesta classe interferem com a estabilidade da proteína CFTR, como por exemplo, mutações que resultam na ausência dos resíduos 70-98 da extremidade C-terminal da proteína (Mekus *et al.*, 1998; Zielenski, 2000). Apesar da extremidade C-terminal não ser necessária para a biogénese e funcionamento do canal de cloreto, esta é indispensável para a manutenção da estabilidade do complexo CFTR glicosilado. O corte mais pequeno da proteína CFTR que provoca FQ, com insuficiência pancreática e infecções pulmonares recorrentes é Q1412X (substituição de uma glutamina por um codão STOP na posição 1412) que resulta na ausência de 70 aminoácidos na proteína (Rowntree and Harris, 2003).

As mutações CFTR são classificadas como severas ou moderadas, dependendo do efeito na proteína funcional e do efeito clínico (Zielenski, 2000). Geralmente, mutações severas resultam na ausência de síntese ou bloqueio do processamento (Classes I, II e III), enquanto que mutações suaves alteram a condução ou redução da síntese (Classes IV, V e VI). Mutações no gene *CFTR* podem resultar, não só em FQ, mas também são observados pacientes com fenótipo parcial de FQ, como ausência congénita bilateral do canal deferente (CBAVD), azoospermia obstrutiva, bronquiectasia, aspergilose broncopulmonar alérgica, hipertripsinémia e pancreatite crónica. Estas doenças foram designadas como “doenças relacionadas com CFTR” (*CFTR related diseases*) (Vankeerberghen *et al.*, 2002) e muitas vezes são associadas a mutações consideradas mais suaves.

I.V – A FQ no mundo

Como já foi referido, a FQ apresenta uma incidência média de 1 em 2000 até 1 em 3000 nascimentos na população europeia, com variações significativas de acordo com o grupo étnico e com a localização geográfica (Bobadilla *et al.*, 2002). A região europeia onde esta doença é mais frequente é no Norte da Irlanda onde, 1 em cada 1700 indivíduos é afectado (Kere *et al.*, 1994). Pelo contrário, a região deste continente onde há menos indivíduos afectados é na Finlândia (1: 25000) (Kahre, 2004). No entanto, existem regiões onde a incidência de FQ atinge valores intermédios, como por exemplo na França (1: 4310), Dinamarca (1:4762), Catalunha (1:5348), Rússia (1:19600) (Lao *et al.*, 2003). Actualmente em Portugal, o aconselhamento genético é feito tendo em conta a frequência de 1 indivíduo com FQ em cada 3000 recém-nascidos (Osório, 1991).

A frequência desta doença varia drasticamente entre as diferentes raças. A FQ é uma doença rara na população africana, com uma frequência estimada de 1: 17000 (Hamosh *et al.*, 1998) e ainda menos comum no Este asiático, com uma frequência de 1:72000 na população indiana (Kapoor *et al.*, 2006) e 1:350000 na população japonesa (Iwasa *et al.*, 2001). Uma maior incidência é observada nas populações americanas destes grupos étnicos (1:15000 nos afro-americanos e 1:31000 nos ázio-americanos), sugerindo uma mistura com a população caucasiana onde a frequência desta doença é mais elevada (Hamosh *et al.*, 1998).

No Norte da América a incidência de FQ é de 1 indivíduo em cada 3500 (Bobadilla *et al.*, 2002). Um estudo efectuado por Roqué e seus colaboradores indica que na Argentina 1 indivíduo em cada 2770 tem FQ (Roqué *et al.*, 2001). Outro estudo efectuado no Rio de Janeiro, no Brasil, indica que a frequência desta doença é de 1:3542 (Cabello *et al.*, 1999).

Investigações prévias evidenciaram que mutações causadoras da doença existem desde o período Paleolítico (50.000 anos) e muitas estão associadas a populações de origem europeia (Bobadilla *et al.*, 2002).

I.VI – Espectro mutacional europeu

A distribuição geográfica das mutações no gene *CFTR* apresenta variações em todo o mundo. A mutação F508del, primeira mutação identificada associada à FQ, ocorre em cerca de 70% dos alelos FQ em populações europeias derivadas da raça caucasiana (Mishra *et al.*, 2005). A frequência da mutação F508del varia com o aparente gradiente de aumento da frequência do Sudeste para o Noroeste da Europa (Rowntree and Harris, 2003), com a mais alta-frequência da mutação na Dinamarca (90%) e mais baixa frequência na Turquia (18,8%) (Mishra *et al.*, 2005). A elevada frequência da mutação F508del indica que cerca de 90% dos pacientes com FQ terão pelo menos uma cópia de F508del; 50-60% dos pacientes serão homocigóticos, enquanto que 30-35% serão heterocigóticos (Massie and Aspersen, 1997). Tem sido proposto que esta elevada frequência da FQ nos caucasianos pode ser devido a uma vantagem dos heterocigóticos para FQ em relação à resistência à diarreia provocada pela cólera e febre tifóide, elevada fertilidade, reduzida taxa de asma e resistência a uma variedade de agentes infecciosos (Schroeder *et al.*, 1995; Rowntree and Harris, 2003). No entanto, faltam evidências para que se confirmem estas teorias.

Para além de F508del, existem mais 4 mutações (G542X, N1303K, G551D e W1282X) no gene *CFTR* que têm frequências globais maiores que 1% nos cromossomas FQ. G542X está

associada a ancestrais Fenícios, é comum nos países do Mediterrâneo, e está presente na maioria dos países europeus, com maior frequência na Ilhas Baleares (16,7%) (Estivill *et al.*, 1997). N1303K está maioritariamente presente nos países mediterrânicos, atingindo maior frequência na Tunísia (17,2%) (Estivill *et al.*, 1997). G551D é comum no Noroeste europeu e Europa Central, sendo menos comum noutras partes da Europa (Estivill *et al.*, 1997). Finalmente a mutação W1282X é comum na maioria dos países mediterrânicos, atingindo maior frequência em Israel (36,2%) (Estivill *et al.*, 1997). Apenas mais 17 mutações neste gene apresentam frequências de 0,1-0,9%, sendo a maioria das restantes raras ou confinadas a populações restritas. (Estivill *et al.*, 1997).

A Europa do Norte, Centro, Oeste e Nordeste apresenta um elevado grau de homogeneidade das mutações no gene *CFTR* (Bobadilla *et al.*, 2002). Pelo contrário, Espanha, Bulgária, Grécia e Turquia possuem um dos mais diversos painéis mutacionais *CFTR* deste continente. Estes países estão situados no território costeiro, permitindo-lhes funcionar como janelas de saída do continente durante longos períodos de migração do Neolítico, o que explica a elevada diversidade mutacional, comparativamente com os restantes países da Europa (Bobadilla *et al.*, 2002).

I.VII – Diagnóstico

I.VII.I – Análise dos electrólitos do suor

As anomalias nos electrólitos do suor foram estabelecidas durante uma onda de calor em Nova Iorque em 1948 (Mishra *et al.*, 2005). Em 1956, Gahm e Shwachman (Gahm and Shwachman, 1956) serviram-se da técnica da análise dos electrólitos do suor para diagnóstico de FQ na sua clínica, mas isto aconteceu antes de Gibson e Cooke, em 1959, descreverem o método da quantificação do cloreto pela iontoforese quantitativa com pilocarpina, que foi aceite como teste padronizado (Mishra *et al.*, 2005).

O teste do suor é desde a sua introdução em 1959 o “*gold standard*” no diagnóstico da FQ. Apesar de existirem vários métodos qualitativos e quantitativos de aferição dos iões sódio e cloreto do suor, a quantificação do cloreto pela iontoforese quantitativa com pilocarpina será o mais aconselhável (Phelan *et al.*, 1990).

A glândula sudorípara é composta por duas regiões diferentes: a região secretora e o

ducto de reabsorção. O suor primário é produzido na região secretora e é isotónico. À medida que as secreções isotónicas vão passando pelo ácino da glândula através do ducto impermeável à água, o sódio e o cloreto são absorvidos, resultando um suor hipotónico. O transporte do sódio estabelece a concentração iónica e o gradiente de voltagem responsáveis pela absorção passiva de cloreto. O cloreto é transportado do lúmen do ducto pelo canal CFTR e por um canal de cloreto activado pelo cálcio (CaCC). O sódio é transportado pelo canal epitelial de sódio, ENaC (*epithelial amiloride sensitive Na⁺ channel*) que também é regulado pelo canal CFTR, por um mecanismo que não é completamente conhecido (Mishra *et al.*, 2005).

As glândulas sudoríparas dos pacientes com FQ não possuem qualquer anomalia histológica, mas sim apresentam anomalias na homeostase sódio-cloreto devido a defeitos da função do canal CFTR. Este problema foi estudado em 1983 por Paul M. Quinton da Universidade da Califórnia, que descobriu que o transporte de cloreto da cavidade ou lúmen das glândulas sudoríparas através do epitélio que delimita essas glândulas não ocorria de modo eficaz nos doentes com FQ. Nestes doentes existia uma baixa permeabilidade de cloreto no epitélio dos ductos sudoríparos, o que conduzia a uma escassa reabsorção de cloreto e sódio. Investigações subsequentes, após a descoberta do gene *CFTR*, demonstraram que a ausência de funcionamento do canal CFTR é responsável pela inibição da reabsorção de cloreto. Apesar de existirem outras vias de absorção de sódio, na ausência do ião Cl⁻, o sódio também é pouco reabsorvido. As consequências deste facto são: 1) o suor resultante possui uma concentração relativamente elevada de cloreto e sódio comparada com o suor normal, 2) elevada razão (> 1) cloreto/sódio em pacientes com FQ comparada com a população normal, 3) a diferença de potencial transepitelial entre o fluído extracelular e o suor dos ductos sudoríparos das glândulas FQ é duas vezes mais negativa do que no suor das glândulas normais. Em indivíduos com FQ o canal CaCC funciona normalmente, pelo que ocorrem algumas modificações do suor isotónico primário (Mishra *et al.*, 2005).

Os valores de cloreto e sódio no suor de indivíduos com FQ são normalmente próximos dos 60mmol/L, podendo atingir 120mmol/L. Em indivíduos normais este valor varia entre os 10 e 50mmol/L (Mishra *et al.*, 2005).

-O teste do suor

Teste do suor é o termo geral que se refere à análise quantitativa e qualitativa do suor para determinar a concentração de electrólitos, condutividade e osmolaridade para diagnóstico da FQ. Geralmente consiste em 3 etapas técnicas: estimulação do suor, colheita e análise. A

análise do suor é seguida pela interpretação dos resultados (Mishra *et al.*, 2005).

O primeiro passo do teste do suor consiste na aplicação da substância pilocarpina (nitrato de pilocarpina) numa pequena área do braço ou da perna (Beauchamp and Lands, 2005). É aplicada uma corrente de 0.5mA que vai aumentando gradualmente até ao máximo de 4mA estimulando a produção de suor. Com a aplicação da corrente eléctrica os iões positivos da pilocarpina provocam um aumento da concentração do cálcio intracelular e estimula a produção de suor pela abertura do canal cloreto activado pelo cálcio (Boucher, 2004; Beauchamp and Lands, 2005).

A concentração do ião cloreto no suor deve ser interpretada tendo em conta a apresentação clínica do paciente, história familiar, idade e conhecimento de que algumas mutações no gene *CFTR* estão associadas a valores limite (“borderline”) ou a concentrações negativas de cloreto no suor (Mishra *et al.*, 2005).

Os valores de referência de cloreto no suor normalmente utilizados para o diagnóstico da FQ em crianças são: <39mmol/L-negativo/normal, 40-59mmol/L – “borderline” (podendo apresentar FQ) e > 60mmol/L – positivo para FQ. Estes valores podem ser diferentes no caso de adultos ou recém-nascidos (Mishra *et al.*, 2005; Beauchamp and Lands, 2005).

É normal o aumento do valor de electrólitos no suor da infância para a idade adulta: indivíduos adultos normais podem ter concentrações de cloreto no suor superiores a 60mmol/L (Davis, 2001). Sendo assim, é preciso algum cuidado na interpretação dos resultados do teste do suor em indivíduos mais velhos.

A concentração de cloreto no suor tem um elevado poder de discriminação: em 98% dos pacientes com FQ este valor é superior a 60mmol/L. Podem no entanto, surgir falsos positivos, mas esta classe de pacientes apresenta geralmente características clínicas distintas dos doentes com FQ (doença de Addison, displasia ectodérmica, diabetes insípido nefrogénico, deficiência de glucose-6-fosfatase, hipotiroidismo, mucopolissacaridoses e má nutrição) (Phelan *et al.*, 1990). Mais de 25% de recém-nascidos normais apresentam uma concentração de sódio maior que 65mmol/L no primeiro dia de vida, mas este valor rapidamente diminui no segundo dia (Mishra *et al.*, 2005).

A concentração de cloreto no suor superior a 160mmol/L é fisiologicamente impossível, sugerindo erros técnicos como a evaporação e contaminação que tendem a produzir valores falsos positivos (Mishra *et al.*, 2005).

A causa patofisiológica mais importante que dá origem a testes de suor falsos negativos é a ocorrência de edema. O edema aparece muito frequentemente em crianças com hipoproteinémia, que por sua vez pode resultar de insuficiência pancreática exócrina, antes do

diagnóstico e tratamento com suplementos pancreáticos enzimáticos. O uso de mineralocorticóides pode também diminuir a concentração de electrólitos no suor (Mishra *et al.*, 2005).

I.VII.II – Análise genética

Os testes moleculares para as mutações no gene *CFTR* fazem parte do diagnóstico de rotina da FQ. Seleccionando um conjunto de mutações a testar, deve ter-se em consideração a taxa de portadores, a frequência das mutações e a taxa de detecção para o painel de mutações que é variável para as diferentes populações. Quando a análise de mutações é utilizada para confirmar o diagnóstico baseado na história clínica e na elevada concentração de electrólitos no suor, deve ser testado o maior número de mutações possíveis (Mishra *et al.*, 2005). O fenótipo para muitas mutações raras não é conhecido pelo que, alguns autores recomendam que apenas sejam testadas mutações em que se conhece associação com clínica de FQ. Os centros capazes de oferecer a sequenciação completa do gene *CFTR* devem ter igualmente a capacidade de interpretar alterações encontradas pela primeira vez. Os avanços tecnológicos podem tornar possível que a sequenciação do gene *CFTR* seja uma técnica rotineira (Rosenstein and Cutting, 1998).

Existem muitos casos em que as características clínicas, o genótipo *CFTR* e a quantificação electrofisiológica são contraditórios relativamente ao diagnóstico de FQ (Warren *et al.*, 1997). Por outro lado, existem situações em que os pacientes apresentam clínica de FQ mas não possuem mutações no gene *CFTR* detectáveis com as técnicas actualmente usadas (Groman *et al.*, 2002).

I.VII.III – Testes auxiliares

Existem outras formas complementares de determinação da função da proteína CFTR, como a diferença de potencial nasal, a quantificação da actividade do canal CFTR intestinal através de biopsias rectais numa câmara de Ussing e o teste de estimulação pancreática para a secreção de electrólitos pelos ductos pancreáticos (Mishra *et al.*, 2005). Estes testes são usados em poucos centros. É possível obter informação adicional acerca da informação clínica recorrendo à função pancreática exócrina (ex. elastase fecal) e microbiologia do tracto respiratório (lavagem broncoalveolar). A avaliação urogenital (análise do sémen) pode também ser útil no diagnóstico da FQ (Stern, 1997).

Em 1999 a Fundação de Fibrose Quística em consenso, recomendou que os critérios de diagnóstico para a definição de FQ devem incluir: presença de uma ou mais características fenotípicas (doença sinopulmonar crónica, insuficiência pancreática, má nutrição, doença do fígado, síndrome da perda de sal ou ausência congénita bilateral do canal deferente) ou história de FQ na família mais próxima, ou rastreio neonatal positivo, junto com a evidência laboratorial de anormalidades no canal CFTR documentadas por 1) elevadas concentrações de cloreto no suor, ou 2) identificação de duas ou mais mutações no gene *CFTR* associadas a FQ, ou 3) demonstração *in vivo* de características anormais no transporte de iões através do epitélio nasal (medição da voltagem transepitelial nasal) (Grosse *et al.*, 2004).

I.VIII – Tratamento

A terapia para FQ tem os seguintes objectivos: preservação da função pulmonar, optimização do estado nutricional, minimização das complicações e manutenção do bem-estar psicossocial. O tratamento deve ser feito preferencialmente em centros especializados que oferecem um serviço compreensivo e multidisciplinar, monitorizam de forma mais rigorosa o desenvolvimento de infecções respiratórias e proporcionam suporte nutricional e psicossocial (Kahre, 2004).

A doença pulmonar constitui o factor limitante para a maioria dos pacientes com FQ, daí que o principal objectivo da terapia consiste em retardar a progressão dos problemas pulmonares através da limpeza mucociliar e o controlo prévio das infecções. Normalmente são administrados mucolíticos para aumentar a expectoração. A monitorização microbiológica regular e o tratamento agressivo com antibióticos para as infecções pulmonares tem-se demonstrado eficaz na redução do número de crianças com infecções crónicas de *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2004). É frequente o uso de fármacos para compensação da perda de actividade do canal de cloreto CFTR, aumentando a actividade de diferentes classes de canais de cloreto nos epitélios afectados (Murray *et al.*, 1999). O transplante pulmonar ou de outros órgãos é a única alternativa em pacientes com danos excessivos irreversíveis (Keck *et al.*, 1999).

É também sabido que a ingestão de alimentos altamente calóricos e ricos em gordura é essencial em indivíduos com FQ. A ingestão de 150% ou mais do valor recomendado de calorias é necessário para assegurar o crescimento normal, devido aos elevados requerimentos energéticos destes pacientes (Koch and Hoiby, 2000).

Os avanços na biologia molecular, biologia celular e electrofisiologia permitem conhecer

as consequências das mutações nas diferentes regiões do gene *CFTR*. Dado que é conhecida a fisiologia do *CFTR*, são criadas diferentes estratégias para encontrar fármacos capazes de corrigir o defeito do transporte iónico (Roomans, 2003). Foram referidas anteriormente, associadas a cada classe de mutação, várias classes de substâncias que podem ser administradas para o tratamento de FQ, de acordo com o defeito proteico (classe da mutação).

Vários estudos clínicos demonstraram que alguns agentes virais e não-virais de transferência de genes são capazes de corrigir o defeito de transporte do ião cloreto na FQ em ratinhos transgénicos. No entanto, são vários os ensaios de terapia génica para FQ que sugerem que os níveis de eficácia de transferência de gene são ainda demasiado baixos para constituir um benefício clínico. Este facto é resultado das várias barreiras extra e intracelulares encontradas pelos vectores de transferência do gene. Por este motivo, a terapia génica para a FQ não foi além dos ensaios laboratoriais (Klink *et al.*, 2004).

I.IX – Rastreio e diagnóstico pré-natal

Desde a descoberta do gene responsável pela FQ que esta doença tem sido alvo de rastreio pré-natal em vários países, devido à elevada frequência que apresenta na população.

Em 1997, o Instituto Nacional de Saúde da América recomendou que deve ser oferecido um rastreio de FQ antes da concepção ou durante a gravidez, para identificar portadores de mutações *CFTR* (NIH, 1999). No entanto, a implementação de um rastreio de portadores de FQ acarreta alguns inconvenientes e preocupações como por exemplo, o grande número de mutações no gene *CFTR*; a diferente frequência das mutações nos vários grupos étnicos, demográficos e raciais; a relação inconsistente entre genótipo-fenótipo para mutações particulares; o facto de que nem todas as mutações *CFTR* provocam FQ. Apesar de serem reconhecidos alguns problemas associados ao rastreio, era também sabido que estas preocupações eram de magnitude similar àquelas associadas a outros programas em prática, como a pesquisa de múltiplos marcadores no sangue da mãe para rastreio de aneuploidias no feto (Grody *et al.*, 2001).

Em 2001, o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas e o Colégio Americano de Genética Médica apresentaram um conjunto de directrizes para a implementação do rastreio pré-natal de FQ, incluindo o painel de mutações e variantes do gene *CFTR* que devem ser testadas como parte integrante dos programas desse rastreio (Watson *et al.*, 2004).

Antes da realização do rastreio é necessário o esclarecimento relativamente a alguns

factores, nomeadamente o objectivo, a natureza voluntária do rastreio, a variedade de sintomas e severidade da doença, a genética da FQ, a estimativa do risco dos pais serem portadores dependendo do grupo étnico ou racial e os factores a considerar na decisão de fazer ou não o rastreio. Mais importante ainda, são as implicações dos resultados positivos e particularmente dos resultados negativos, que devem ser cuidadosamente explicados. Quando é detectado o estado de portador nos pais (verdadeiros positivos) esta situação provocará excesso de ansiedade e stress, relacionados com o aumento dos riscos do feto e a decisão de fazer o diagnóstico pré-natal (Wald *et al.*, 2003).

Existem duas formas de rastreio que podem ser seguidas pelos casais antes ou durante a gravidez. No primeiro método, ambos os membros do casal são testados e os resultados são avaliados em conjunto. Este método revela o estado de portador de ambos os membros do casal e prevê com maior segurança o risco do feto. No segundo método, chamado rastreio sequencial, o teste é geralmente oferecido a um membro do casal, normalmente à mulher. Só é feito o teste no outro elemento do casal (neste caso, o pai) se o resultado do primeiro teste (mãe) for positivo (Wilson *et al.*, 2002). O rastreio sequencial revela-se mais rentável e pode conduzir a uma diminuição da ansiedade, especialmente em casais nos quais o primeiro elemento a ser testado tem um resultados negativo.

O objectivo destes programas de rastreio pré-natal consiste em identificar gravidezes de risco, sendo em última instância acompanhados por diagnóstico pré-natal. Usando técnicas que permitam a identificação de 85% dos portadores, numa população com uma frequência de portadores de 1 em 24, a frequência com que ambos os membros do casal são portadores é de 1 em 800 casais (Bonham *et al.*, 2003). É importante referir que um teste negativo não garante que o feto não seja afectado, mas diminui o risco.

O rastreio durante a gravidez é acompanhado da limitação relativamente ao momento do diagnóstico pré-natal e interrupção da gravidez por indicação clínica. Normalmente, a identificação de gravidezes de risco deve ocorrer antes das 20 semanas de gestação, de forma a ser feito o diagnóstico pré-natal e se necessário, a interrupção da gravidez antes de ser atingido o limite de tempo legal para o fazer.

O diagnóstico pré-natal é indicado quando ambos os progenitores são portadores de mutações no gene *CFTR* e, sendo assim, o feto tem $\frac{1}{4}$ de probabilidade de ser afectado (Wilson *et al.*, 2002). Uma indicação adicional para a realização do diagnóstico pré-natal é a detecção de intestino hiperecogénito no feto através da ecografia no segundo trimestre de gestação. O intestino hiperecogénito é encontrado em aproximadamente 0,1% das gravidezes no segundo trimestre e pode ser devido a FQ, variação normal, anomalias cromossómicas ou infecção

congénita viral. Nestes casos, é estimado um risco devido a FQ de 3 a 13% (Richards and Grody, 2004).

Para a realização de diagnóstico pré-natal podem ser utilizadas amostras directas e culturas de vilosidades coriônicas e amniócitos. As amostras de vilosidades coriônicas podem ser obtidas durante o primeiro trimestre de gravidez (até aproximadamente às 10 semanas), enquanto que a amniocentese é feita no segundo trimestre (cerca das 16 semanas). Ambos são métodos invasivos e possuem um pequeno risco de perda do feto de aproximadamente 1% (Richards and Grody, 2004). A amostra do feto deve ser testada no mesmo laboratório onde foram testadas as amostras dos pais, de forma a assegurar a interpretação dos resultados segundo os mesmos critérios. Para além disso, aquando a análise da amostra do feto, deve ser realizado um teste de investigação de contaminação materna na mesma amostra, para que seja excluída a possibilidade de contaminação com células maternas, que constitui uma fonte de erro no diagnóstico pré-natal.

I.X – Rastreio neonatal

Desde a introdução dos cartões de “Guthrie” na década de 60, que a fenilcetonúria pode ser detectada logo após o nascimento, por doseamento da concentração de fenilalanina em sangue seco de bebés recém-nascidos. Desde então, os programas de rastreio têm-se alargado a uma variedade de doenças (Pollitt, 1993; Bamforth, 1994; Loeber *et al.*, 1999). O rastreio neonatal tornou-se uma parte indispensável dos cuidados de saúde em todos os países desenvolvidos.

A possibilidade de obter um diagnóstico precoce de FQ a partir do rastreio neonatal surgiu quando Crossley e seus colaboradores (Crossley *et al.*, 1979) revelaram que os níveis de tripsina imuno-reactiva (IRT) são altos em recém-nascidos com esta doença.

Não existe um consenso em relação ao rastreio neonatal de FQ, porque ainda está por esclarecer se os benefícios ultrapassam os custos e os efeitos indesejáveis. Até à data, só alguns países como a Austrália, Nova Zelândia, França, Áustria, Polónia, Estados Unidos e Inglaterra possuem programas nacionais de rastreio neonatal. No entanto, estes programas não são estabelecidos uniformemente ao longo do território nacional. Na maioria destes países, não existe legislação específica ou critérios de orientação, nos quais o rastreio neonatal de FQ se deveria basear (Santos *et al.*, 2005).

Desde o encontro da Sociedade Internacional de Rastreio Neonatal em 1996 (Pollit,

1998), que as vantagens clínicas de um rastreio neonatal se tornaram um pouco mais claras. O diagnóstico tardio e a elevada prevalência de sintomas precoces possíveis de serem tratados, tem sido bem documentada e aceite durante algum tempo. É também claro que sem rastreio, um número significativo de crianças com FQ permanece sem diagnóstico até ao nascimento de um segundo filho afectado na família (Lane *et al.*, 1998).

Os argumentos a favor do rastreio neonatal consistem nos inadiáveis benefícios do diagnóstico precoce: a possibilidade de tratamento precoce. Evita o diagnóstico tardio, reduz a ansiedade dos familiares e impede que a criança receba tratamento para doenças erradas (Wilcken and Travert, 1999). Ao identificar indivíduos afectados, é possível reduzir a morbilidade ou a mortalidade precoce. O diagnóstico precoce ajuda os profissionais de saúde que estão directamente ligados a estas crianças a compreenderem melhor a doença e a sua história natural, bem como dá a oportunidade aos pais de tomarem os devidos cuidados durante o primeiro ano de vida. Sendo assim, pratica-se uma medicina inteligente, é possível o aconselhamento genético oportuno, sendo permitido fazer escolhas reprodutivas em relação a gravidezes futuras (Bonham *et al.*, 2003). Parece indiscutível que existem benefícios precoces para os pacientes diagnosticados no rastreio neonatal.

Tendo em conta estes aspectos, o futuro ideal para a FQ consiste no rastreio neonatal e tratamento dos pacientes desde cedo, em centros especializados na doença.

A análise da tripsina-imunoreactiva (IRT) tem sido o método mais usado no rastreio neonatal de FQ. O tripsinogénio é uma pro-enzima produzida pelo pâncreas, que normalmente atinge o lúmen intestinal onde é activado para tripsina. Em pacientes com FQ a obstrução dos ductos pancreáticos impede a secreção do tripsinogénio e a sua chegada ao intestino, resultando numa acumulação desta proteína no sangue de indivíduos com esta doença. (Santos *et al.*, 2005).

O sangue deve ser colhido entre o segundo e o sexto dia de vida, a partir daí começa a haver decréscimo dos níveis de enzima à medida que o tempo passa.

São vários os protocolos utilizados no rastreio neonatal de FQ (Wilcken and Willey, 2003). Existem países que recorrem ao ensaio de IRT realizado em dois tempos separados, seguido do teste do suor. Noutros países, estes testes são acompanhados de testes moleculares, tendo particular interesse quando usados para detectar o alelo mutante mais comum (F508del) ou para a análise de múltiplas mutações associadas à FQ (Farrel *et al.*, 2001).

Um problema da utilização dos ensaios de IRT é a falta de consenso relativamente ao valor normal. O número de falsos negativos depende do valor limite escolhido. Se o valor limite de IRT for elevado, existe um elevado risco da ocorrência de falsos negativos. Pelo contrário,

com um valor limite demasiado baixo, maior é o risco de existirem falsos positivos (Wilcken and Travert, 1999).

O rastreio molecular oferece maior taxa de detecção e segurança relativamente ao rastreio bioquímico, permitindo a identificação de portadores e total especificidade (Mahadeva *et al.*, 1998).

Têm sido propostos diferentes protocolos de rastreio, desde que foram descobertas diferentes mutações. Ainda não existe uma uniformidade entre países, ou mesmo entre diferentes regiões do mesmo país, devido ao facto das frequências das mutações diferirem entre estes (Santos *et al.*, 2005).

Os argumentos relacionados com os eficientes cuidados de saúde e os resultados emergentes das crianças afectadas, parece justificar o rastreio neonatal de FQ. No entanto, em 1997 os participantes no workshop “Centers for Disease Control and Prevention – Newborn Screening for Cystic Fibrosis: A Paradigm for Public Health Genetics Policy Development” (CDC, 1997) sugeriram que as vantagens associadas ao rastreio neonatal de FQ não são suficientes para que este seja incluído no painel “*standard*” de testes no período neonatal. Antes do rastreio mundial de FQ ser recomendado como rotina de saúde pública, são necessários dados mais concretos acerca da sua eficácia. Esta evidência deve incluir uma melhor descrição das consequências do diagnóstico tardio, informação acerca das diferenças do desenvolvimento cognitivo causadas pela má nutrição, dados que estabeleçam os benefícios pulmonares do diagnóstico precoce e a relação custo-benefício do diagnóstico precoce através do rastreio neonatal (Grosse *et al.*, 2004).

Para que uma doença possa ser objectivo de rastreio sistemático no recém-nascido, deve responder positivamente a algumas questões fundamentais: fácil colheita de sangue; relação custos/benefícios aceitável; frequência elevada e resposta médica eficaz. A FQ responde muito positivamente às primeiras questões, mas a falta de tratamento específico tem sido o principal obstáculo na institucionalização do rastreio, principalmente nos países que procedem ao rastreio do hipotireoidismo congénito e da fenilcetonúria (Osório, 1991).

Em 1989 foi apresentado ao Ministério da Saúde um projecto de rastreio experimental para 100.000 recém-nascidos, no sentido de determinar se a relação custo/benefício justificaria a sua institucionalização em Portugal (Osório, 1991).

Esse projecto apresentado em conjunto com a Associação Portuguesa de Fibrose Quística e Comissão Nacional para o Diagnóstico Precoce, analisou a problemática de rastreio em termos de aproveitamento das estruturas já existentes. O rastreio seria feito por doseamento da tripsina imuno-reactiva por rádio-imuno-ensaio, aproveitando-se para o efeito, todo o

esquema montado para o rastreio do hipotiroidismo congénito e da fenilcetonúria, desde a organização até à utilização do equipamento. Em relação à colheita, não haveriam alterações a fazer, visto que o sangue habitualmente obtido era suficiente para mais um doseamento (Osório, 1991).

A frequência da FQ em Portugal não era conhecida, mas por comparação com estudos feitos noutros países estimava-se que fosse de aproximadamente 1/3000, o que significava que em cada ano nasciam cerca de 50 crianças com esta doença (Osório RV, 1991).

Se por um lado é verdade que uma doença sem cura não deva, em princípio ser rastreada, foram vários os estudos que demonstraram que o diagnóstico precoce de FQ efectuado a partir do rastreio, pode reduzir o tempo de hospitalização de cada doente, além de contribuir decisivamente para uma melhor qualidade de vida do doente. A economia resultante desta menor taxa de hospitalização pagava por si só as despesas do rastreio, parecendo assim que apesar da falta de tratamento específico, a relação custos/benefícios era francamente favorável. Acrescendo o facto de que os pais das crianças doentes poderiam ser informados, antes do nascimento de um segundo filho, das vantagens em recorrer a uma consulta de aconselhamento genético e, eventualmente de diagnóstico pré-natal (Osório, 1991).

Existiam porém alguns factores limitativos a ter em conta. O primeiro é que se tratava de um rastreio a dois tempos, uma vez que existia uma percentagem mínima de recém-nascidos que apresentam valores elevados de tripsina imuno-reactiva, não associada a FQ. Estes valores normalizam por volta da terceira ou quarta semana de vida e obrigam, nestes casos, a contactar os pais e a proceder a um segundo doseamento. O segundo ponto a considerar era a necessidade de criação de centros de tratamento especializados, pelo menos em Lisboa, Porto e Coimbra, aptos para receber cerca de 40 a 50 crianças por ano e a prestar todo o apoio médico de que elas necessitassem. Na altura havia informação de que este último objectivo estava em vias de ser conseguido e, sendo assim, concluiu-se que estavam reunidas as condições para que se iniciasse o rastreio experimental desta doença (Osório, 1991).

Entre 1992 e 1995 efectuou-se o rastreio experimental de FQ nos distritos do Porto e Coimbra, mas não teve continuidade por ser fundamentalmente uma doença sem tratamento (Osório, 1991).

II – OBJETIVOS

O principal objectivo deste trabalho foi a determinação da prevalência da mutação F508del em indivíduos portugueses saudáveis, com origem em várias regiões geográficas do país. Com a determinação da frequência da mutação F508del na população portuguesa caucasiana, será possível calcular a prevalência de portadores de FQ em Portugal e consecutivamente calcular a incidência da doença neste país com base em dados populacionais. Estes valores terão imediatamente uma aplicação prática nas consultas de aconselhamento genético neste país e no cálculo do risco para FQ. Os dados obtidos neste trabalho também permitirão, pela primeira vez, um cálculo pormenorizado da relação custo/benefício de um programa de rastreio neonatal, em analogia com alguns países nórdicos, onde este procedimento já está em vigor.

III – MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo foram irreversivelmente anonimizadas conforme estipulado no Artº 19 da Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro (Anexo A). Estas amostras deram entrada no Centro de Genética Clínica para testes de paternidade e eram de indivíduos saudáveis provenientes de todo o país, incluindo regiões autónomas. Das 500 amostras totais, foi tido o cuidado de que pelo menos 150 amostras fossem de indivíduos com origem geográfica no Norte do país e 150 indivíduos com origem geográfica no Sul. Deste modo, as amostras utilizadas neste estudo foram divididas da seguinte forma: 259 amostras de indivíduos com origem geográfica no Norte, 167 amostras de indivíduos com origem geográfica no Sul, 58 amostras de indivíduos com origem geográfica no Centro e 16 amostras de indivíduos provenientes das Ilhas. Foi tida atenção no sentido de não serem incluídos na amostra indivíduos aparentados. Apenas foram incluídos neste estudo portugueses de origem caucasiana.

O tipo de material utilizado neste estudo apresenta alguma diversidade: DNA, sangue periférico em papel de filtro e células bucais em papel de filtro.

III.I – Amostras

DNA

Para maioria das amostras utilizou-se directamente o DNA que já tinha sido previamente extraído para a realização de outros testes. Estas amostras de DNA, na sua maioria extraídas de amostras de sangue periférico em EDTA pelo método “*salting out*”, (Anexo B) são estáveis durante um longo período de tempo, quando respeitadas as boas condições de armazenamento (-20°C).

Todas as amostras foram quantificadas e diluídas à mesma concentração (62,5ng/µL). Formaram-se *pools* de 5 amostras, de forma a que a concentração de cada amostra na *pool* fosse igual (12,5ng/µL).

Sangue periférico e células bucais em papel de filtro

Para estas amostras também existia DNA extraído, no entanto, dado que algumas extracções eram provenientes de amostras muito antigas (desde 1999 a 2006) e o DNA extraído deste material é menos estável, foi realizada uma nova extracção: formaram-se *pools* de 5 amostras (amostras de sangue separadas das amostras de células bucais) e fez-se a extracção de DNA através do método salino.

O gráfico seguinte representa uma simulação aproximada do número de amostras a

incluir em cada *pool* e o número de PCRs (*polimerase chain reactions*) que seriam necessárias realizar na totalidade, dependendo da prevalência de portadores F508del. O número ideal de amostras para juntar numa *pool* seria entre 5 até 7, dependendo da prevalência de portadores. Foi escolhido o número 5 por ser tecnicamente mais fiável (menor risco de perder a sensibilidade) e por garantir que seria possível concluir o estudo com a realização de um número máximo de 200 PCRs, se a prevalência de portadores F508del fosse menor que 1/25.

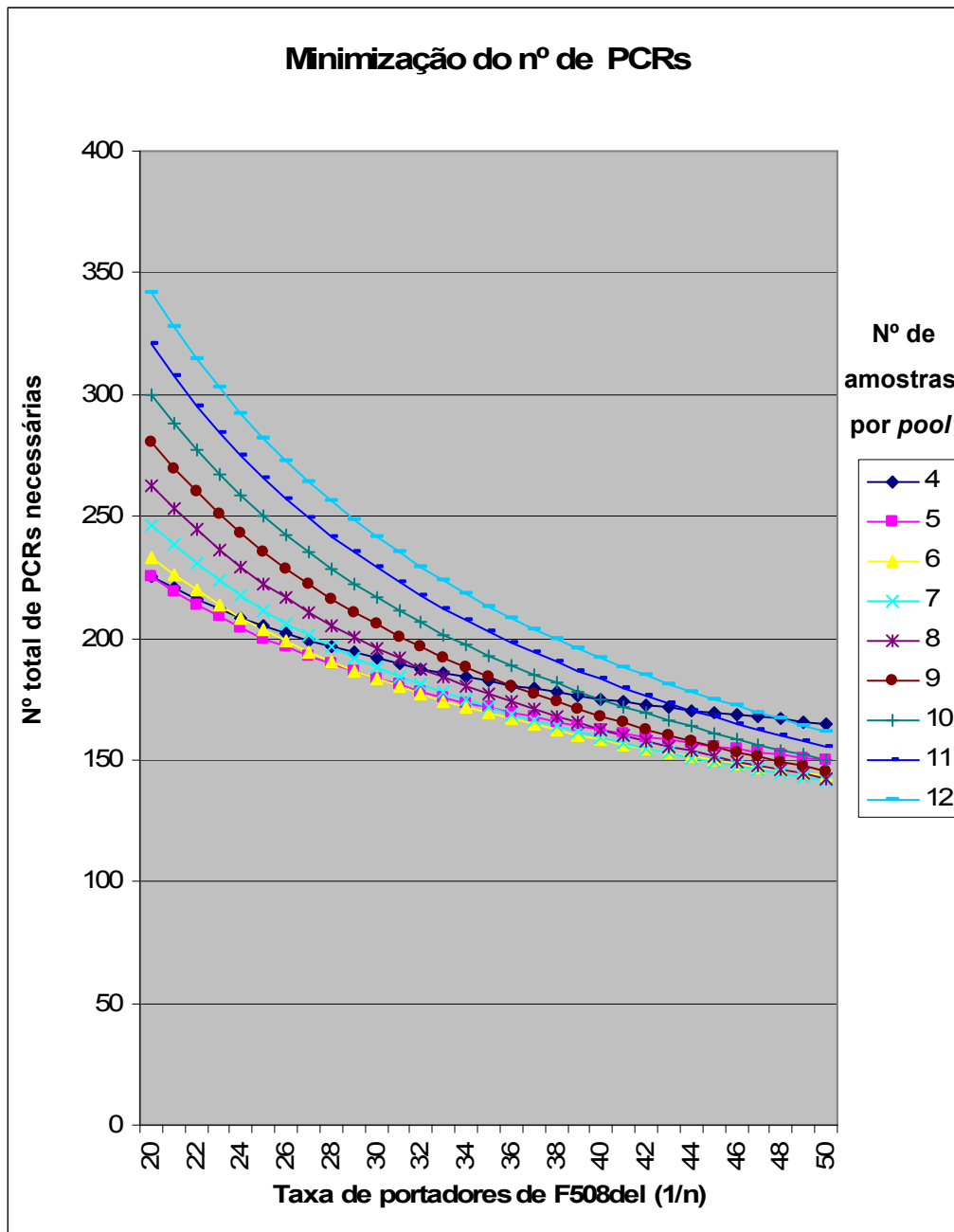


Figura 4 – Número total de PCRs necessárias e número ideal de amostras a incluir nas *pools* tendo em conta a taxa de portadores F508del.

III.II – Métodos

III.II.I Extracção de DNA

Para cada amostra foram cortados 2 círculos de papel de filtro e colocados num tubo *ependorf*. Cada tubo *ependorf* continha uma *pool* de 5 amostras (10 círculos) que foram processadas da seguinte forma:

Lise das células nucleadas: adicionou-se 900µL de Cell Lysis Solution (Gentra), 4,5µL de Proteinase K (Gentra) e incubaram-se as amostras a 55°C, durante pelo menos 3 horas.

Precipitação das proteínas: adicionou-se 300µL de Protein Precipitation Solution (Gentra), homogeneizou-se no vórtex durante 20 segundos à velocidade máxima, colocou-se no gelo durante 15 minutos e centrifugou-se durante 5 minutos a 13000-14000 rpm.

Precipitação do DNA: o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *ependorf* contendo 900µL de Isopropanol 100% (v/v) (Merck) e 1,5µL de Glycogen Solution (Gentra), inverteu-se suavemente o tubo *ependorf* (50 vezes), colocou-se no gelo durante 15 minutos e centrifugou-se durante 5 minutos a 13000-14000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante, adicionou-se 900µL de etanol a 70% (v/v) (Merck) e inverteu-se o tubo de forma a lavar o sedimento de DNA. Centrifugou-se durante 1 minuto a 13000-14000 rpm, rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se secar durante 15-20 minutos.

Hidratação de DNA: adicionou-se cerca de 50µL de DNA Hydration Solution (Gentra) e colocou-se no banho a 55°C durante pelo menos 3 horas, após as quais o DNA estava pronto a utilizar.

Estas amostras não foram diluídas, uma vez que as concentrações obtidas eram mais baixas do que as das amostras de sangue periférico em EDTA.

Todas as amostras foram submetidas a 2 metodologias distintas: a) Bi-PASA e gel de agarose; b) PCR fluorescente e GeneScan (ABI 310).

III.II.II – Bi-PASA e gel de agarose

A PCR pode ser utilizada para para detecção rápida de alterações numa única base de DNA, usando um método de amplificação de alelos específicos (PASA - PCR Amplification of Specific Alleles). O princípio do método consiste no desenho de um *primer* que amplifique preferencialmente um alelo relativamente ao outro. A amplificação específica pode ser obtida se

o *primer* emparelhar com o alelo desejado e não emparelhar com o outro alelo, na extremidade 3' do *primer* (Ye *et al.*, 2001). No entanto, cada reacção PASA apenas fornece informação em relação à presença/ausência de um único alelo. São necessárias duas reacções para determinar a zigocidade da alteração. O método Bi-PASA (Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles) tem como base a PCR alelo-específica para amplificar simultaneamente dois alelos em direcções opostas (Figura 5). Está provado que o Bi-PASA é um método robusto e versátil (Liu *et al.*, 1997).

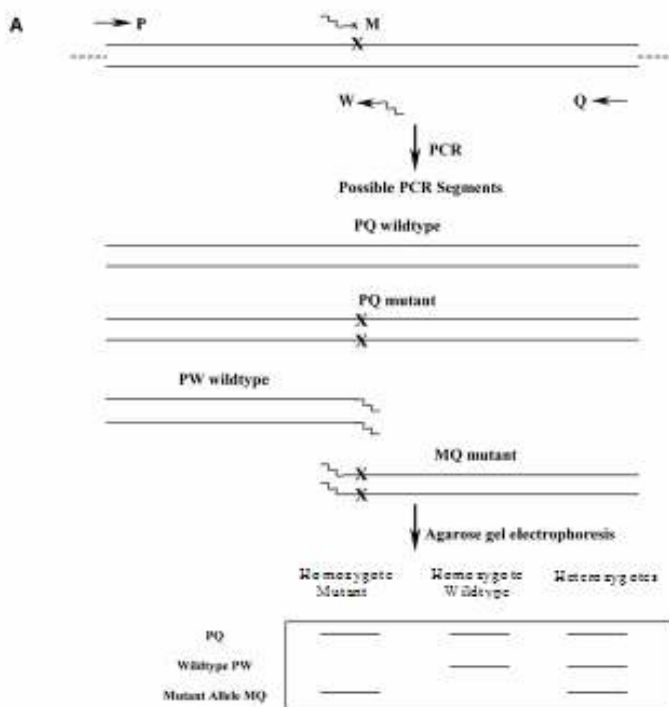


Figura 5 – Esquema representativo do princípio do método Bi-PASA. Os 4 *primers* (P,Q,M,W) estão representados por setas. X representa a mutação. As linhas onduladas no final dos *primers* representam as caudas não complementares na extremidade 5'. O segmento PQ para além de ser o *template* para os segmentos MQ e PW, funciona como controlo positivo interno para cada ensaio (Maciel *et al.*, 2003).

Princípio do método Bi-PASA

Para o método Bi-PASA são necessários 4 *primers*: 2 externos (P e Q) e dois *primers* internos alelo-específicos (M e W). P e Q devem emparelhar a diferentes distâncias da alteração (mutação) na sequência para se diferenciarem os segmentos PASA *Down* e *Up* no gel de agarose (Figura 5). Os *primers* internos (M e W) consistem em duas partes: uma pequena região que é complementar a um dos alelos e uma cauda não complementar de 10pb rica em G+C na extremidade 5' (Liu *et al.*, 1997; Maciel *et al.*, 2003). Esta cauda é usada para prevenir o *megapriming*, que ocorre quando um segmento gerado por PCR nos ciclos iniciais actua como *primer* do DNA genómico nos ciclos seguintes. Para além disso, esta sequência não complementar aumenta a eficácia de amplificação dos segmentos P-W e M-Q nos ciclos tardios

da PCR devido a um aumento de região de complementaridade (Maciel *et al.*, 2003).

Dependendo da zigocidade, o Bi-PASA produz 2 ou 3 segmentos: PQ é sempre produzido e serve como controlo positivo, PW e MQ ambos estão presentes num heterozigótico (WT/M), mas só PW é produzido num homozigótico *wild-type* (WT/WT) e MQ só é produzido num homozigótico mutante (M/M) (Liu *et al.*, 1997).

Nesta parte do trabalho, a detecção da mutação F508del foi feita através da amplificação de uma parte do exão 10 do gene *CFTR* pelo método Bi-PASA. O DNA foi amplificado utilizando os *primers* e o procedimento descritos por Maciel *et al.*, 2003 (Tabela 3).

Tabela 3 - *Primers* utilizados no Bi-PASA para F508del (adaptado de Maciel *et al.*, 2003).

Primer	Sequência^a (5'----> 3')	Tm (°C)^b
P	CTGAATCATGTGCCCTTCTC	60
Q	CATTCACAGTAGCTTACCCAT	60
M	gggccgggggATTAAGAAAATATCATT	40
W	ggcggcggggATAGGAAACACCAAA	40

a Parte das sequências M e W são caudas não complementares

b Tm é calculada pela fórmula de Wallace = 2°C por cada A ou T e 4°C por cada G ou C. Tm é calculada para o DNA genómico original.

Para a PCR Bi-PASA foi usada 1U *Taq Gold* DNA polimerase (Applied Biosystems), num volume total de 25µL: 50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH8,3; 2,5 mM MgCl₂ (fornecidos juntamente com a enzima *Taq Gold*); 200µM cada dNTP's (Invitrogen). A amplificação foi feita num termociclador T1 thermocycler (Biometra). Fez-se uma desnaturação inicial de 10 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 3 segmentos: desnaturação a 94°C durante 15s, emparelhamento a 55°C durante 30s, e amplificação a 72°C durante 1min. Finalmente fez-se uma extensão final a 72°C durante 10min. A concentração dos *primers* internos utilizada (0,6µM) foi 1,5 vezes superior à concentração dos *primers* externos.

Tabela 4 – Volume de reagentes por cada PCR Bi-PASA.

Reagente (solução stock)	Volume na reacção (µL)
<i>Taq Gold</i> DNA polimerase (5U/µL)	0,2
MgCl ₂ (25mM)	2,5
dNTP's (100 mM)	0,05 cada dNTP
GeneAmp 10x PCR buffer II (com Tris-HCl 100mM e KCl 500 mM)	2,5
<i>Primers</i> internos M e W (10µM)	0,75 cada <i>primer</i>
<i>Primers</i> externos P e Q (10µM)	0,5 cada <i>primer</i>
DNA* (12,5ng/µL)	2
Água Biotech*	15,1

*Para as amostras extraídas de papel de filtro pipetaram-se 3µL de DNA e 14,1µL de água.

Em cada PCR foram incluídos um controlo negativo (*pool* com 5 amostras de indivíduos normais) e um controlo positivo (*pool* com 4 amostras de indivíduos normais e 1 amostra de um indivíduo heterozigótico para F508del).

Os produtos de amplificação foram aplicados num gel de agarose 2% (p/v) esperando-se os seguintes tamanhos de fragmentos: 587pb (PQ), 414pb (PW) e 226pb (MQ).

III.II.III – PCR fluorescente e GeneScan (ABI 310)

A detecção da mutação F508del através deste método teve como base a realização de uma PCR fluorescente seguida de electroforese capilar num aparelho ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Todas as *pools* de amostras utilizadas no método anterior foram submetidas a este método. As amostras foram amplificadas pela PCR, com a particularidade de os *primers* utilizados serem fluorescentes, para que fosse possível a análise dos fragmentos amplificados num aparelho de detecção de fluorescência (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer). Após serem colocadas as amostras no aparelho, todos os aspectos da corrida, recolha de dados e análise são automáticos.

Princípio do método da análise de fragmentos

O aparelho 310 Genetic Analyzer separa os fragmentos de DNA através da utilização de uma matriz de corrida – *Performance Optimized Polymers* (POP) – cuja família inclui o POP- 6, polímero para aplicações de alta resolução, como a sequenciação, e o POP- 4 para corridas mais rápidas como a análise de fragmentos ou sequenciação rápida. O sistema permite o

enchimento automático do capilar com polímero. Após serem colocadas no aparelho, as amostras são injectadas automaticamente no capilar antes de cada corrida. Através da aplicação de um campo eléctrico as moléculas de DNA migram pelo capilar, em direcção ao ânodo, passando pela janela de detecção. À medida que vão passando pela janela vão sendo estimuladas por um laser de argon, emitindo fluorescência. Uma série de lentes (espelhos) direcciona e foca as emissões fluorescentes num espectrógrafo onde vão ser separadas em função do comprimento de onda. Estes dados vão ser convertidos sob forma de informação digital que vai ser processada por um *software* adequado.

Com base no programa *Primer Express v2.0* foram desenhados os *primers* direccionados para a região que compreende o codão 508 do exão 10 do gene *CFTR* (Tabela 5).

Todos os *primers* (incluindo os Bi-PASA) foram testados *in silico* com auxílio do programa *Primer Express* e usando um programa para análise de *primers* – *Virtual PCR v2.0* (Vpccr 2.0: <http://grup.cribi.unipd.it/cgi-bin/mateo/vpccr2.cgi>). Todos os *primers* utilizados foram sintetizados pela empresa MWG Biotech.

Tabela 5 – *Primers* utilizados na PCR fluorescente para F508del.

<i>Primer</i>	Sequência (5'---> 3')	T _m (°C) ^b
^a FAM-508-F	FAM-CAGTGGGAAGAATTTTCATTCTGT	60
FAM-F508-R	FAM-CTTCTAGTTGGCATGCTTTGA	60

^a A cada *primer* foi adicionado o fluorocromo FAM (azul)

^b T_m é calculada pela fórmula de Wallace = 2°C por cada A e T ou 4°C por cada G ou C. T_m é calculada para o DNA genómico original.

Para cada PCR fluorescente foi usada a solução *Platinum PCR Supermix* (Invitrogen) com a seguinte constituição: 22U/mL complexo recombinante *Taq* DNA polimerase com *platinum Taq Antibody*; 22mM TrisHCl pH 8,4; 55mM KCl; 1,65mM MgCl₂; 220µM de cada dNTP. O programa de amplificação utilizado foi o anteriormente descrito.

Tabela 6 – Volume de reagentes por cada PCR fluorescente.

Reagente (solução stock)	Volume na reacção (µL)
<i>Platinum PCR Supermix</i>	22,5
<i>Primers</i> F e R (10µM)	0,5 cada
DNA* (12,5ng/µL)	0,5

*Para as amostras extraídas de papel de filtro pipetou-se 1µL de DNA.

Neste caso também foram incluídos um controlo negativo (*pool* com 5 amostras de indivíduos normais) e um controlo positivo (*pool* com 4 amostras de indivíduos normais e 1 amostra de um indivíduo heterozigótico para F508del).

A detecção dos produtos amplificados foi realizada por electroforese capilar num ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), esperando-se os tamanhos de 127pb (WT) e 124pb (M).

Após PCR, as amostras foram preparadas para corrida electroforética. Foi feita uma mistura dos produtos da PCR com padrão interno e formamida, na seguinte proporção: 1µL da amostra : 0,5µL GeneScan-500 [ROX] (Applied Biosystems) : 14µL Hi-Di Formamida (Applied Biosystems). O padrão interno (ROX500) foi usado para criar uma equação de regressão usada no cálculo do tamanho dos fragmentos da amostra. A mistura foi desnaturada a 95°C durante 5 minutos e depois colocada a 4°C cerca de 3 minutos.

As amostras correram num capilar de 47cm (Applied Biosystems) com POP4, usando um módulo por defeito para a corrida de microssatélites. Cada amostra correu durante 20 minutos, à temperatura de 60°C com uma voltagem de corrida de 15kV. Os dados da corrida foram recolhidos pelo *software* GeneScan Data collection v.3.0 (Applied BioSystems) e analisados recorrendo ao programa GeneScan Analysis v.3.7 (Applied BioSystems). Para que a análise fosse feita correctamente foi necessário o uso de matrizes que contêm informação para correcção da sobreposição espectral. A sobreposição espectral ocorre quando uma parte do espectro de emissão de uma cor se sobrepõe ao o pico de fluorescência de outra cor.

III.III – Cálculos

Os cálculos baseiam-se no pressuposto de que em todos os doentes portugueses com FQ, 49,5% dos alelos são F508del (Pacheco, 2000), valor que foi calculado com base na análise de mais de 400 amostras de doentes portugueses. Para além disso, assume-se que a população em estudo se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, isto é, as frequências genotípicas são iguais aos produtos probabilísticos entre as frequências genéticas respectivas (Hardy 1908; Weinberg 1908).

Para a determinação dos intervalos de confiança de 95% foi aplicada a fórmula da distribuição binomial para um grande número de amostras (> 30) descrita por Bailey (Bailey, 1976).

Normalmente são feitas n observações das quais a possuem uma determinada propriedade específica, neste caso, ser heterozigótico para F508del. Supondo que a probabilidade de encontrar um indivíduo heterozigótico para F508del é p ($=1- q$), podemos usar a/n para estimar p (Bailey, 1976). Sendo assim, a fórmula usada para calcular a frequência de indivíduos F508del com um intervalo de confiança de 95% é a seguinte:

$$a/n \pm \sqrt{\frac{a/n(1-a/n)}{n}} \quad (\text{Bailey, 1976})$$

IV – RESULTADOS

A pesquisa da mutação F508del pela análise de 500 indivíduos (1000 cromossomas) provenientes de diferentes regiões geográficas do país permitiu a detecção de 11 indivíduos heterozigóticos para esta mutação.

As figuras 6 e 7 são um exemplo dos resultados obtidos na análise das 500 amostras.

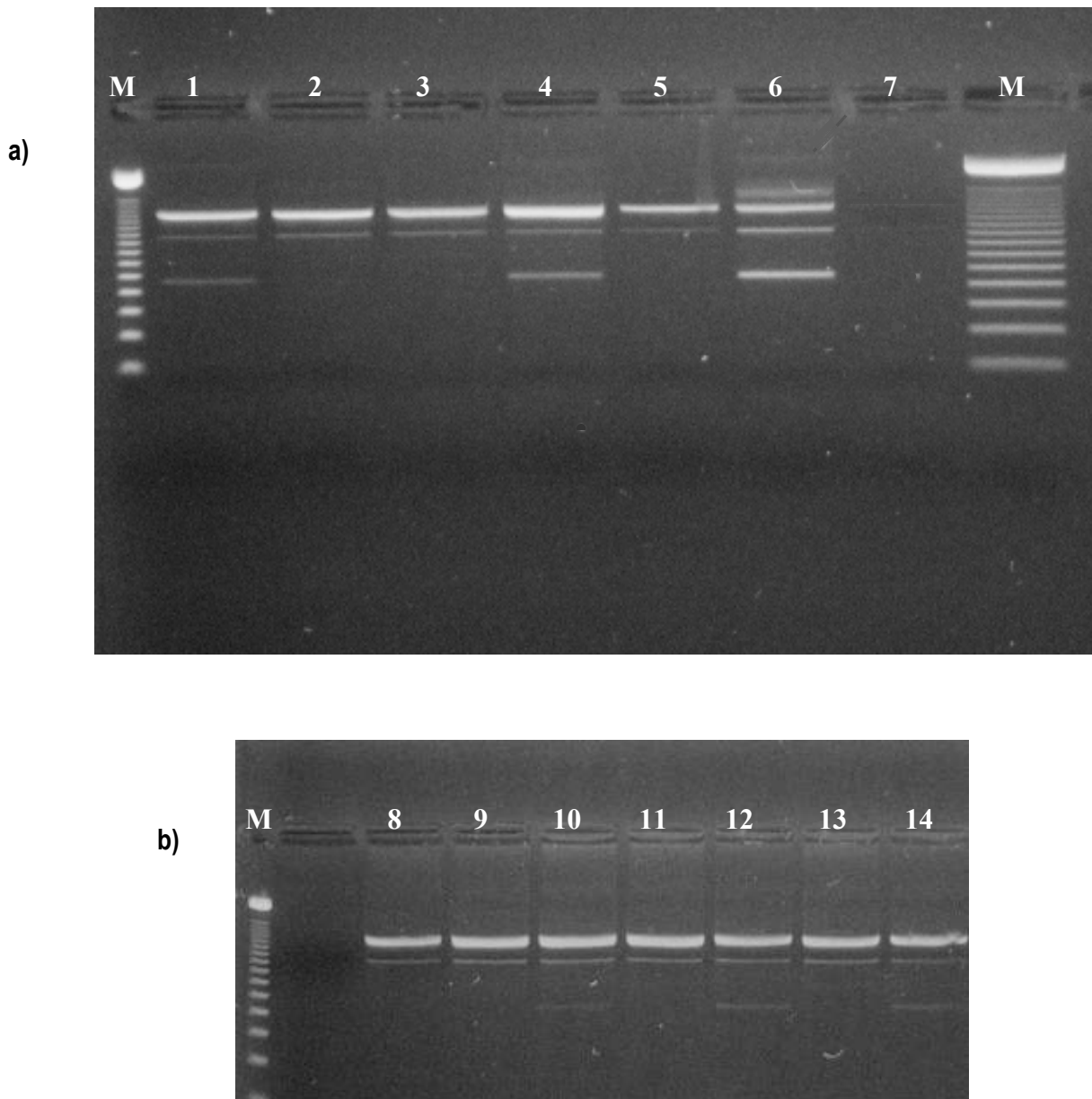


Figura 6 – Exemplo dos resultados da genotipagem F508del pelo método Bi-PASA.

a) Amostras amplificadas individualmente: **M** – marcador de peso molecular 50bp; **5** - controlo negativo; **6**- controlo positivo (heterozigótico F508del); **7**– branco; **1,4**– amostras heterozigóticas para F508del (WT/M); **2,3** – amostras normais (WT/WT).

b) Amostras amplificadas em *pools* de 5: **M**-marcador de peso molecular 50bp; **8,9,11,13** – *pools* normais (WT/WT); **10,12,14** – *pools* positivas com pelo menos uma amostra heterozigótica para F508del (WT/M).

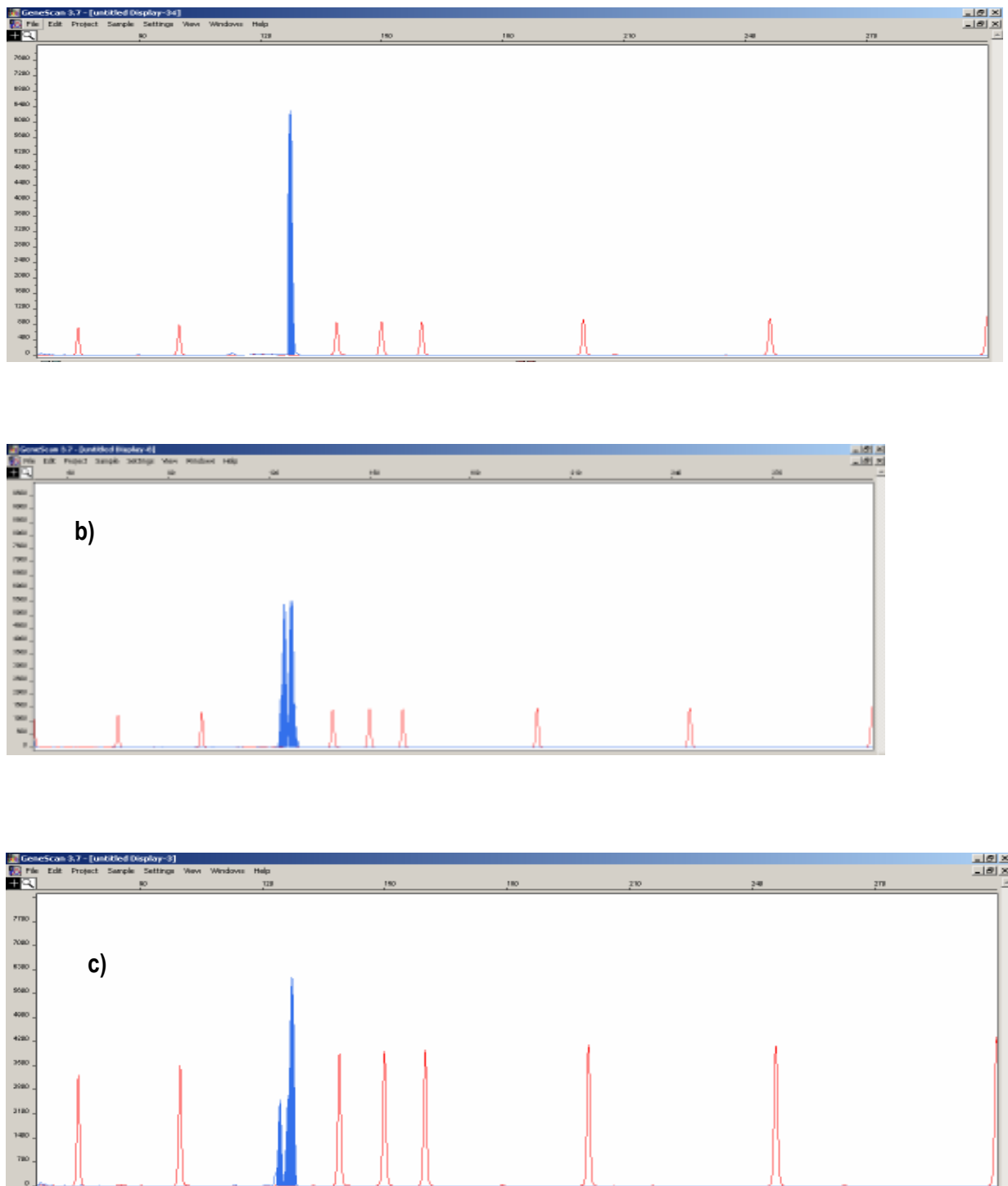


Figura 7 – Exemplo dos resultados da genotipagem F508del pelo método da PCR fluorescente e Gene Scan.

a) – amostra normal (WT, WT); b) – amostra heterozigótica para F508del (WT/M); c) *Pool* positiva com pelo menos uma amostra heterizigótica para F508del (WT/M).

Das 500 amostras estudadas de todo o país, os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 7 – Distribuição da mutação F508del nas diferentes regiões geográficas.

Região geográfica de Portugal	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras heterozigóticas para F508del
Norte	259	5
Centro	58	2
Sul	167	4
Ilhas	16	0
TOTAL	500 (1000 cromossomas)	11

Tendo em conta estes resultados, podemos calcular a frequência de portadores da mutação F508del e fazer uma estimativa da incidência de FQ na população portuguesa.

Cálculos:

Tabela 8 – Prevalência de portadores da mutação F508del e estimativa da incidência da FQ na população portuguesa.

Prevalência de portadores da mutação F508del (Número de indivíduos com a mutação F508del) (2q)	11:500 (2,2%) (1,54% a 2,86%, IC=95%)
Incidência de indivíduos homozigóticos para F508del (= q ² , pelo princípio de Hardy-Weinberg)	1:8264 (0,12:1000)
Estimativa da incidência da FQ devido a todas as mutações *	1:2025 (1:1303 a 1:3779 ; IC=95%)

* Considerando que a frequência da mutação F508del nos indivíduos portugueses com FQ é de 49.5% (Pacheco, 2000).

V – DISCUSSÃO

Pela análise do gel de agarose (Figura 6), no qual foram separados por electroforese os produtos da PCR Bi-PASA, é possível verificar que nas amostras de indivíduos normais para F508del (WT/WT) aparecem duas bandas (587 e 414 pb), enquanto que para as amostras de indivíduos heterozigóticos para F508del (WT/M) são produzidas 3 bandas (587, 414 e 226 pb). Comparando as bandas da figura 6a com as bandas da figura 6b, é evidente o decréscimo de intensidade da banda de 226 pb. Isto deve-se ao facto das bandas da figura 6b corresponderem a *pools* de 5 amostras amplificadas em conjunto. Sendo assim, a banda exclusiva dos heterozigóticos é de intensidade reduzida porque corresponde apenas a uma amostra no meio de 5.

Pela análise dos resultados da electroforese capilar (Figura 7), onde foram separados os produtos da PCR fluorescente, é possível verificar que para as amostras de indivíduos normais (WT/WT) surge apenas um pico de fluorescência, com o tamanho de 127 pb. Nas amostras de indivíduos heterozigóticos para F508del (WT/M) aparecem dois picos de tamanhos 127 (WT) e 124 (M) pb. Estes dois picos diferem apenas em 3 pb, correspondentes à eliminação dos três ácidos nucleicos, que resultam na deleção do aminoácido fenilalanina. Quando as amostras são amplificadas em conjuntos de 5 (Figura 7c) é igualmente evidente o decréscimo do tamanho do pico que corresponde ao fragmento com a deleção F508del. Nas amostras amplificadas individualmente, os dois picos têm o mesmo tamanho (Figura 7b) dado que o número de cromossomas com deleção é igual ao número de cromossomas sem deleção. Quando as amostras são amplificadas em conjunto, o pico que corresponde à mutação F508del aparece mais pequeno porque corresponde a uma única amostra num conjunto de 5, consequentemente o sinal fluorescente é menor.

Cada *pool* positiva foi desdobrada, para que as amostras fossem tratadas individualmente e se avaliasse a positividade da *pool* (quantas amostras positivas existiam). Foram amplificadas 100 *pools*, das quais 11 foram positivas. Por cada *pool* positiva não houve mais do que uma amostra heterozigótica para F508del, obtendo-se desta forma, uma frequência de 2,2% de portadores desta mutação na população portuguesa.

Os dois métodos utilizados na realização deste trabalho produziram o mesmo resultado e revelaram ser eficazes na detecção da mutação F508del. No entanto, pelo método Bi-PASA, é teoricamente possível distinguir a mutação F508del da mutação I507del (muito rara) (Maciel *et al.*, 2003), ao contrário da PCR com *primers* fluorescentes. Este facto deve-se aos *primers* utilizados na PCR fluorescente emparelharem igualmente com as sequências F508del, I507del e WT, sendo a distinção feita apenas com base na determinação do tamanho do produto da PCR,

enquanto que no método Bi-PASA os *primers* internos são alelo-específicos, isto é, só emparelham com a sequência F508del (Maciel *et al.*, 2003).

Comparando a incidência média da doença a nível europeu e de acordo com os dados deste estudo, a incidência de FQ em Portugal é muito superior ao que actualmente está publicado e está dentro dos limites estimados para este continente (1 indivíduo em 2000 a 3000 recém-nascidos) (Bobadilla *et al.*, 2002).

Tendo em conta que a FQ é mais comum na população de origem caucasiana do que em indivíduos de outras origens (Hamosh *et al.*, 1998), e que neste estudo apenas foram incluídos portugueses de origem caucasiana, pode explicar-se parcialmente porque é que a incidência determinada neste estudo é mais elevada do que os valores estimadas até à data para a população portuguesa.

Para calcular esta estimativa foi considerado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, embora existam influências menores que possam indicar que a população estudada não se encontra em equilíbrio: uma família com uma criança afectada pode optar por não ter mais filhos ou recorrer ao aconselhamento genético com possível interrupção de gravidez, no caso do feto ter novamente FQ. Isto poderia causar uma redução da incidência real da FQ em relação ao valor calculado. Para além disso, indivíduos masculinos com uma mutação F508del têm maior probabilidade de serem inférteis devido a CBAVD (se forem portadores de outra mutação suave no segundo alelo do gene *CFTR*) (Vankeerberghen *et al.*, 2002). Por estas razões, a taxa de reprodução deve ser ligeiramente menor neste grupo e por isso devem nascer ligeiramente menos indivíduos com FQ do que o calculado neste estudo teórico.

Com base nestes dados, deve ter-se em consideração que em indivíduos portugueses de origem caucasiana, o aconselhamento genético deve ser feito de acordo com a incidência de FQ na Europa (1:2500), em vez do valor que actualmente se usa (1:3000).

Com base no valor estimado neste trabalho, a FQ é mais frequente em Portugal do que em diversos países europeus, nomeadamente a França (1:4310), Dinamarca (1:4762), Holanda (1:3968), Noruega (1:6579), Rússia (1:19600) (Lao *et al.*, 2003). No entanto, comparando Portugal com o Norte da Irlanda, esta continua a ser a região onde a frequência da FQ é maior (1:1700) (Kahre, 2004).

Pode, de igual forma, comparar-se a frequência da FQ obtida neste estudo (1:2025) com as restantes regiões do mundo, nomeadamente a África (1:17000) (Hamosh *et al.*, 1998) e países do Este asiático como a Índia (1:72000) (Kapoor *et al.*, 2006) e o Japão (1:350000) (Iwasa *et al.*, 2001), onde esta doença é relativamente rara, comparando com o continente europeu, especificamente com Portugal. O mesmo não se pode dizer do Norte (1:3500)

(Bobadilla *et al.*, 2002) e algumas regiões do Sul da América (1:3542, Brasil; 1: 2770, Argentina) (Cabello *et al.*, 1999; Roqué *et al.*, 2001) em que a frequência da FQ está mais próxima do valor obtido neste trabalho.

O diagnóstico molecular tem importância como instrumento adicional, auxiliando no diagnóstico e tratamento prévio dos pacientes com FQ. A frequência da maioria das mutações no gene *CFTR* é altamente variável e depende da origem étnica ou geográfica dos progenitores dos indivíduos afectados. Para a implementação de um protocolo de rastreio molecular específico, é necessário compreender o espectro de mutações da FQ, para que os testes sejam o mais direccionados possível (Bobadilla *et al.*, 2002). Uma vez que a mutação F508del é a mutação da FQ mais frequente, pode utilizar-se como auxiliar de rastreio (Farrel *et al.*, 2001).

VI – CONCLUSÃO

A importância deste trabalho radica, principalmente, no facto de ser o primeiro estudo realizado em Portugal sobre a frequência de portadores de FQ baseado no rastreio de um grande número de pessoas saudáveis e seleccionadas aleatoriamente. Para além disso permitiu conhecer a prevalência da mutação FQ mais importante (2,2%) na população portuguesa de origem caucasiana.

O presente estudo corrobora com os dados bibliográficos que referem que a FQ é uma doença relativamente frequente na população caucasiana. Com base na incidência da FQ obtida neste estudo (1/2025) deve ter-se em consideração que em indivíduos portugueses de origem caucasiana o aconselhamento genético deve ser feito de acordo com a incidência de FQ na Europa (1:2500), em vez do valor que actualmente se usa (1:3000).

Apesar da FQ ser uma doença para a qual não existe cura, já foram referidas as vantagens do rastreio neonatal desta doença. Os custos de um rastreio para esta doença estão dentro dos limites, comparativamente com outros programas de rastreio. Tendo em conta que já se conhece a incidência da FQ em Portugal, e esta, pelo menos nos portugueses de origem caucasiana, se encontra dentro das frequências estimadas para a população europeia, estão reunidas as condições para a implementação de um programa de rastreio neonatal de FQ, em analogia com alguns países nórdicos.

VII- BIBLIOGRAFIA

- Amaral MD. CFTR and Chaperones; Processing and Degradation. *J Mol Neurosci*. 2004; 23:41-48.
- Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child*. 1938; 56:344-399.
- Anderson C, Roomans GM. Activation of delta F508 in a cystic fibrosis respiratory epithelial cell line by 4-phenylbutyrate, genistein and CPX. *Eur Respir J*. 2000; 15: 937-941.
- Aris RM, Merkel PA, Bachrach LK, Borowitz DS, Boyle MP, Elkin SL, Guise TA, Hardin DS, Haworth CS, Holick MF, Joseph PM, O'Brien K, Tullis E, Watts NB, White TB. Consensus statement: guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (3): 1888-1896.
- Bailey NTJ. Statistical Methods in Biology. *Hodder and Stoughton*, London, Sydney, Auckland and Toronto. 1976 Chapters 2, 3.
- Bamforth FJ. Laboratory screening for genetic disorders and birth defects. *Clin Biochem*. 1994; 27: 333-342.
- Beauchamp M, Lands LC. Sweat –Testing: a review of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol*. 2005; 39: 507-511.
- Bear CC, Li H, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR). *Cell*. 1992; 68: 809-819.
- Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, Ferrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002; 19: 575-606.
- Bonham JR, Downing M, Dalton A. Screening for cystic fibrosis: the practice and the debate. *Eur J Pediatr*. 2003; 162: S42-S45.
- Boucher RC. New concepts of pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2004; 23: 146-158.
- Breuer W, Kartner N, Riordan JR, Cabantchik ZI. Induction of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10465-10469.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnruhl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 2481-2489.
- Cabello GMK, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Rosa AS, Llerena Jr J, Greg J, Grody WW, Degraive WM, Fernandes O, Cabello PH. Cystic fibrosis: low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol*. 1999; 71 (2): 189-198.
- CDC. Newborn screening for cystic fibrosis: a paradigm for public health genetics policy development: proceedings of a 1997 workshop. *MMWR*. 1997; 46(No. RR-16):1-24.
- Censos 2001. *INE*, Recenseamento Geral da População e Habitação, 2001; disponível em http://www.ine.pt/prodserv/censos/index_censos.htm.
- Collen HR. Cystic fibrosis. Wilson JD *et al.* eds. *Harrison's Princ Intern. Med*. 1991; 1072-1074.
- Crossley JR, Elliot RB, Smith PA. Dried blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1979; 1: 472-474.
- Cutting GR. Cystic Fibrosis. In: Rimo DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds) *Emery and Rimon's principles and practice of medical genetics*. Churchill-Livingstone London, 1997:2685-2717.
- Cystic Fibrosis Mutation Database (CFMDB) (última actualização 2 de Março de 2007) disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>.
- Davis PB. Cystic fibrosis. *Pediatr Rev*. 2001; 22: 257-264.

- Davis PB. Cystic Fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 475-482.
- Davis PB, Drumm M, Konstan MW. State of the Art-Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 1229-1256.
- Devuyst O, Guggino WB. Chloride channels in the kidney: lessons learned from knockout animals. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283: F1176-1191.
- Dorwart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cyst Fibros.* 2004; 3: 91-94.
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. Correction in cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus - mediated gene transfer. *Cell.* 1990; 62: 1227- 1233.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C, Biomed CF. Mutation Analysis Consortium: Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat.* 1997; 10: 135-154.
- Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien Med Wschr.* 1936; 86: 753-756.
- Farrel PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, Hoffman G, Laessing RH, Splaingard ML. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics.* 2001; 107:1-13.
- Fonseca JA, Cernadas JR. Fibrose quística - variabilidade fenotípica, avanços na patogenia. *R. Port Imunoalerg.* 1999; 7(1) : 19-29.
- Gahm N, Shwachman H. Studies in cystic fibrosis of the pancreas; a simple test for the detection of excessive chloride on the skin. *N Engl J Med.* 1956; 255:999-1001.
- Genra, disponível em <http://WWW.genra.com/>.
- Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ, (Subcommittee on Cystic Fibrosis Screening, Accreditation of Genetic Services Committee, ACMG). Laboratory standards and guidelines for population based cystic fibrosis carrier screening. *Gen Med* 2001; 3 (2):149-154.
- Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med.* 2002; 347:401-407.
- Grosse SD, Boyle CA, Botkin JR, Comeau AM, Kharrazi M, Rosenfeld M, Wilfond BS. Newborn Screening for Cystic Fibrosis- Evaluation of Benefits and Risks and Recommendations for State Newborn Screening Programs. *MMWR-* 2004; 53(RR13): 1-36.
- Guggino WB, Stanton BA. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 426-436.
- Hamosh A, Fitzsimmons SC, Macek M Jr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr.* 1998; 132: 255-259.
- Hardy HG. Mendelian proportions in a mixed population. *Science.* 1908; 28: 49-50
- Hwang TC, Sheppard DN. Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20:448-453.
- Illek B, Fischer H, Santos GF, Widdicombe JH, Machen TE, Reenstra WW. cAMP-independent activation of CFTR Cl⁻ channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Am J Physiol.* 1995; 268:886-893.
- Iwasa S, Fujiwara M, Nagata M, Watanabe T. Three autopsied cases of cystic fibrosis in Japan. *Pathol Int.* 2001; 51:467-472.
- Kahre T. Cystic Fibrosis in Estonia. *Dissertationes Biologicae Universitatis Tartuensis.* 2004.

- Kapoor V, Shastri SS, Kabra M, Kabra SK, Ramachandran V, Arora S, Balakrishnan P, Deorari AK, Paul VK. Carrier frequency of F508del mutation of cystic fibrosis in Indian population. *J Cyst Fibros*. 2006; 5(1): 43-6.
- Keck BM, Bennett LE, Rosendale J, Daily OP, Novick RJ, Hosenpud JD. Worldwide thoracic organ transplantation: a report from the UNOS/ISHLT International Registry for Thoracic Organ Transplantation. *Clin Transpl*. 1999; 35-49.
- Kere J, Estivill X, Chillón M, Morral N, Nunes V, Norio R, Savilahti E, de la Chapelle A. Cystic fibrosis in low-incidence population: two major mutations in Finland. *Hum Genet*. 1994; 93:162-166.
- Kerem B, Johanna M, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
- Kerem E. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2005; 40: 183-196.
- Kelley TJ, Al-Nakkash L, Drumm M. CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; 13: 657-664.
- Klink D, Schindelhauer D, Laner A, Tucker T, Bebok Z, Schwiebert EM, Boyd AC, Scholte BJ. Gene delivery systems – gene therapy for cystic fibrosis. *J.Cyst Fibros*. 2004; 3: 203-212
- Knowles MR, Gatzky J, Boucher RC. Increased bioelectric potential differences across respiratory epithelium in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1981; 305: 1489-1498.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Ficher N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 1983; 221: 1067-1070.
- Koch C, Hoiby N. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration*. 2000; 67: 239-247.
- Lane B, Harris R, Harris H. Neonatal screening for cystic fibrosis. Early diagnosis allows option of prenatal diagnosis in subsequent pregnancies. *Br Med J*. 1998; 317.
- 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: 385-394.
- Lee TW, Brownlee KG, Denton M, Littlewood JM, Conway SP. Reduction in prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*. 2004; 37:104-110.
- Lee TWR, Matthews DA, Blair GE. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*. 2005; 387: 1-15.
- Li C, Ramjeesingh M, Reyes E, *et al*. The cystic fibrosis mutation (DeltaF508) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat Genet*.1993; 3: 311–316.
- Liu Q, Thorland EC, Heit JA, Sommer SS. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res*. 1997; 7: 389-398.
- Luo J, Pato MD, Riordan JR, Hanrahan JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol*. 1998; 274: C1397-1410.
- Loeber G, Webster D, Aznarez A. Quality evaluation of newborn screening programs. *Acta Pediatrics Supplement*. 1999; 432:1-6.
- Maciel P, Yan J, Feng J, Accurso F, Sommer S. Single-tube method for determination of F508del genotype in CFTR gene using bidirectional PCR amplification of specific alleles. *BioTechniques*. 2003; 34 (3): 460-462.
- Mahadeva R, Webb K, Westerbeek RC, Carrol NR, Dodd ME, Bilton D, Lomas DA. Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis: cross sectional study. *BMJ*. 1998; 316: 1771-1775.

- Massie J, Asperon PV. Management of cystic fibrosis: what's new? *Modern Med Aust.* 1997; 88-102.
- Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Dork T, Bijman J, Tummler B, Veeze HJ. Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Genet.* 1998; 102: 582-586.
- Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005; 26: 135-153.
- Murray J, Cuckle H, Taylor J, Littlewood J, Hewison J. Sreening for Cystic Fibrosis. *Heath Techn Assessm.* 1999; 3 (8): 1-104.
- NIH - Consensus Development Conference Statement. Genetic testing for cystic fibrosis. April, 1997. *Arch Intern Med.* 1999;159:1529-1539.
- Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep.* 2004; 5(11):1071-1077.
- Okay TS, Oliveira WP, Júnior RR, Rodrigues JC, Negro GMBD. Frequency of the $\Delta F508$ mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics.* 2005; 60(2):131-134.
- Osório RV. Fibrose quística do pâncreas – projecto de rastreio em Portugal. *Bol Hosp.* 1991; 4 (2): 43-45.
- Pacheco, P. Apresentação oral no Curso ABC da Genéica Clínica. 23/24 Nov. 2000. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.
- Phelan PD, Landau LI, Olinsky A, eds. Cystic fibrosis. *Respir illn childr.* 1990; 210-229.
- Pollit RJ. Neonatal screening for cystic fibrosis. Early diagnosis is important to parents even if it makes little difference to outcome. *Br Med J.* 1998; 317-411.
- Pollitt RJ. Neonatal screening. *J Clin Pathol.* 1993; 46: 497-9.
- Quinton PM. Missing Cl⁻ conductance in cystic fibrosis. *Am J Physiol.* 1986; 251: C649-C652.
- Richards CS, Grody WW. Prenatal screening for cystic fibrosis: past present and future. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 4(1): 49-62.
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson D, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature.* 1990; 347:258-363.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Drumm ML, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989; 245: 1066-1073.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
- Roomans GM. Pharmacological approaches to correcting the ion transport defect in cystic fibrosis. *Am J Respir Med.* 2003; 2: 413-431.
- Roqué M, Godoy CP, Castellanos M, Pusiol E, Mayorga LS. Population screening of F508del (DeltaF508), the most frequent mutation in the CFTR gene associated with cystic fibrosis in Argentina. *Hum Mutat.* 2001; 18: 167.
- Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998; 132: 589-595.

- Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003; 67: 471-485.
- Santos GPC, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosario NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Paraná: evaluation 30 months after implementation. *J Pediatr.* 2005; 81(3): 240-244.
- Schroeder SA, Gaughan DM, Swift M. Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat Med.* 1995; 1:703-705.
- Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev.* 1999; 79:109-144.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature.* 1993; 362:160-164.
- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999; 79: S23-45.
- Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1997; 336: 487-491.
- Tilly BC, Winter MC, Ostedgaard LS, Riordan CO, Smith AE, Welsh MJ. Cyclic AMP-dependent protein kinase activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in planar lipid bilayers. *J Biol Chem.* 1992; 267: 9470-9473.
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros.* 2002; 1: 13-29.
- Virtual PCR 2.0 (Vpcr 2.0) disponível em: <http://grup.cribi.unipd.it/cgi-bin/mateo/vpcr2.cgi>.
- Wald NJ, Morris JK, Rodeck CH, Haddow JE, Palomaki GE. Cystic fibrosis: selecting the prenatal screening strategy of choice. *Prenat Diagn.* 2003; 23: 474-483.
- Warren WS, Hamosh A, Egan M, Rosenstein BJ. False positive results of genetic testing in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1997; 130: 658-660.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinge RW, Mennuti M, Palomaki GE, BW Popovich, Pratt VM, Rohlf EM, Strom CM, Richards CS, Witt DR, Grody WW. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Gen Med.* 2004; 6 (5): 387-391.
- Weinberg W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg.* 1908; 64: 368-382.
- Welsh MJ, Smith AE. Cystic Fibrosis. *Sci Am.* 1995; 273: 52-59.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993; 73: 1251-1254.
- Wilcken B, Travert G. Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: present and future. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 432: 33-35.
- Wilcken B, Willey V. Newborn screening methods for cystic fibrosis. *Pediatr Resp Rev.* 2003; 4: 272-277.
- Wilson RD, Davies G, Desilets V, Reid GJ, Shaw D, Summers A, Wyatt P, Young D, Crane J, Armson A, de la Ronde S, Farine D, Leduc L, Van Aerde J. Cystic Fibrosis Carrier Testing in Pregnancy in Canada. *J Obstet Gynaecol Can.* 2002; 24 (8): 644-651.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: E88-8.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem.* 1991;

266: 9140-9144.

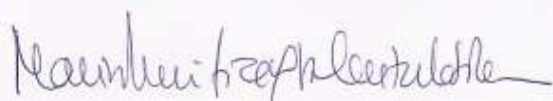
Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000; 67: 117 – 133.

VIII- ANEXOS

Declaração

Maria da Purificação Valenzuela Sampaio Tavares, Professora Catedrática de Genética Médica da FMDUP, membro da Direcção do Colégio da Especialidade de Genética Médica da Ordem dos Médicos e Directora Clínica do CGC Centro de Genética Clínica, e a Professora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Directora Técnica do Laboratório de Biologia Molecular do CGC Centro de Genética Clínica declaram que as amostras que constituem o estudo "Frequência da mutação F508del na população Portuguesa", no âmbito da tese de mestrado da Dra. Marisa Raquel Costa Teixeira foram irreversivelmente anonimizadas conforme estipulado no Artº 19 da Lei nº 12/2005 de 26 de Janeiro.

Porto, 23 Fevereiro de 2007



Prof. Doutora Purificação Tavares
Direcção Clínica CGC
Especialista em Genética Médica
Prof. Catedrática Genética Médica



Doutora Alexandra Fernandes
Direcção Técnica
Doutorada em Biotecnologia

Anexo B

Protocolo de extracção de DNA de sangue periférico

Lise de células vermelhas

1. Pipetar 4,5 ml de RBC Lysis Solution para um tubo de 10 ml. Adicionar 1,5 ml de sangue periférico e homogeneizar invertendo o tubo várias vezes. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Centrifugar a 3000-4000 rpm durante 10 minutos. Remover totalmente o sobrenadante, invertendo o tubo sobre papel absorvente.
3. Ressuspender o sedimento no vortex.
4. Adicionar 3 ml de RBC Lysis Solution ao sedimento, homogeneizar invertendo o tubo várias vezes. Incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Centrifugar a 3000-4000 rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante deixando 50-100 µl de líquido residual.
6. Ressuspender o sedimento usando o vórtex, de forma a facilitar o próximo passo de lise.

NOTA: Se o sedimento obtido estiver vermelho deve-se repetir as lavagens com RBC Lysis Solution.

Lise de células nucleadas

1. Adicionar 1,5 ml de Cell Lysis Solution e pipetar “up and down”.
As amostras são estáveis em Cell Lysis Solution durante 18 meses à temperatura ambiente.

NOTA: Por vezes a amostra pode conter um número elevado de células nucleadas, pelo que pode ser necessário aumentar o volume de Cell Lysis Solution.

Precipitação de proteínas

1. Adicionar 0,5 ml de Protein Precipitation Solution e homogeneizar no vórtex durante 20 segundos à velocidade máxima.
2. Centrifugar durante 10 minutos a 3000-4000 rpm. O precipitado de proteínas deve ser castanho e compacto (se o precipitado não estiver compacto, voltar a homogeneizar no vórtex e colocar em gelo durante 5 minutos, voltar a centrifugar).

Precipitação do DNA

1. Pipetar para um novo tubo de 10 ml 1,5 ml de isopropanol (2-propanol) a 100% e adicionar o sobrenadante do tubo com o precipitado de proteínas.

2. Inverter o tubo aproximadamente 50 vezes, com movimentos suaves, até aparecer o precipitado de DNA (semelhante a um novelo).
3. Rejeitar o sobrenadante, com cuidado para não perder o novelo de DNA, deixando cerca de 1 ml. Verter para um tubo eppendorf, confirmando a presença do novelo de DNA.
4. Centrifugar durante 3 minutos a 13000-14000 rpm.
5. Rejeitar o sobrenadante e secar o tubo invertendo-o sobre papel absorvente. Cuidado para não se perder o sedimento de DNA.
6. Adicionar 0,5 ml de etanol a 70%. Inverter os tubos aproximadamente 25 vezes de forma a lavar o sedimento de DNA.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 13000-14000 rpm.
8. Rejeitar o sobrenadante com muito cuidado. Secar o tubo invertendo-o sobre papel absorvente.
9. Deixar o tubo a secar na câmara de fluxo laminar durante 15 a 20 minutos.

NOTA: Pode ser necessário adicionar mais isopropanol para que ocorra precipitação quando a quantidade de DNA é elevada.

Hidratação de DNA

1. Adicionar cerca de 200 µl de DNA Hydration Solution.
2. Colocar no banho a 54-58°C até o sedimento de DNA deixar de ser visível e se obter uma solução homogénea.
3. Deixar a amostra atingir a temperatura ambiente e guardar à temperatura de 1 a 2-6°C.
4. Para armazenamento a longo prazo, coloca-se à uma temperatura de -18 a -22°C.

Adaptado de Gentra (<http://WWW.gentra.com/>)