

# Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação $\Delta F508$

Recebido em 14/03/02  
Aceito para publicação em 03/05/02

*Cystic fibrosis screening by two-tiered newborn IRT assay and  $\Delta F508$  mutation molecular analysis*

Giselda M.K. Cabello<sup>1</sup>  
Pedro H. Cabello<sup>2</sup>  
Sílvia R.S. Roig<sup>1</sup>  
Armando Fonseca<sup>3</sup>  
Eulália C.D. Carvalho<sup>4</sup>  
Octavio Fernandes<sup>5</sup>

## unitermos

Fibrose cística  
Mutação  $\Delta F508$   
Imunotripsina reativa  
Rastreamento neonatal

## resumo

Um total de 117 cartões de rastreamento neonatal foi selecionado anonimamente para a avaliação de fibrose cística (FC) pela análise da mutação  $\Delta F508$  usando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida (Page) e pela quantificação da imunotripsina reativa (IRT, Delfia). Uma concentração de IRT menor que 140ng/ml foi encontrada em 116 recém-nascidos. Entre estes foi detectado um heterozigoto  $\Delta F508$  com uma concentração de IRT de 4,44ng/ml. Um dos 117 recém-nascidos era homozigoto não- $\Delta F508$  e apresentava uma IRT anormal de 410,7ng/ml. A média da concentração da IRT diferia significativamente conforme este recém-nascido com IRT alterada era incluído ou excluído da amostragem populacional ( $n = 117$ , média =  $8,207 \pm 38,101$ ;  $n = 116$ , média =  $4,737 \pm 6,597$ , respectivamente). Outra amostra de oito recém-nascidos, previamente rastreados pelo teste de IRT e com níveis elevados do analito, foi testada para a mutação  $\Delta F508$ . Em cinco deles a mutação  $\Delta F508$  foi encontrada em um ou em ambos os cromossomos, correspondendo a 62,25% dos recém-nascidos. De acordo com os resultados obtidos com triagem neonatal pela análise combinada IRT/DNA, pode-se concluir que o método só será eficiente se: a) forem excluídos os fatores que determinam os falso-positivos ou falso-negativos; e b) a detecção de outras mutações forem incluídas na análise dos resultados duvidosos.

## abstract

*A total of 117 newborn screening cards were anonymously selected for cystic fibrosis (CF) screening, searching for the  $\Delta F508$  mutation using polymerase chain reaction (PCR) followed by polyacrylamide gel electrophoresis (Page) and by quantification of Immunoreactive trypsin (IRT, Delfia). In 116 newborns an IRT concentration lower than 140ng/ml was evidenced. One of these was a  $\Delta F508$  heterozygote with an IRT concentration of 4,44ng/ml. One newborn was a non- $\Delta F508$  homozygote with an IRT concentration of 410,7ng/ml. The IRT concentration average was significantly different if the newborn with the abnormal IRT was included or excluded from the population sample ( $n = 117$ , means =  $8.207 \pm 38.101$ ;  $n = 116$ , means =  $4.737 \pm 6.597$ , respectively). Another sample of 8 newborns previously screened by IRT test and with elevated IRT levels was analyzed for  $\Delta F508$  mutation. The  $\Delta F508$  mutation was found in one or both chromosomes in five newborns, corresponding to 62.25% of the sample. Results obtained with two-tier IRT/DNA analysis showed that the approach only will be effective if: a) factors leading to false positives and false negatives are excluded; and b) molecular analysis of other mutations are included among those children with undefined results.*

## key words

Cystic fibrosis  
 $\Delta F508$  mutation  
Immunoreactive trypsin  
Newborn screening

1. Biologista do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz.
2. Pesquisador titular do Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz.
3. Diretor do Centro de Diagnóstico e Pesquisa Dr. Raymundo Britto – Apae/Rio.
4. Farmacêutica do Centro de Diagnóstico e Pesquisa Dr. Raymundo Britto – Apae/Rio.
5. Pesquisador adjunto do Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz e do Departamento de Patologia e Laboratórios, FCM, Uerj.

## Introdução

O gene responsável pela fibrose cística (FC), uma doença genética autossômica recessiva comum em populações brancas, foi isolado e seqüenciado em 1989 (5, 10, 16). Codifica uma proteína de 1.480 aminoácidos envolvida no transporte de cloro para o interior da célula, denominada *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). O gene possui 27 éxons, ao longo dos quais mais de mil diferentes mutações já foram identificadas, a maioria delas com frequências muito baixas e próprias de determinadas populações (5, 6).

De todas as mutações no gene CFTR, a mais freqüente é a mutação  $\Delta F508$ , uma deleção de um códon para a fenilalanina na posição 508 da proteína. Este mutante está presente em aproximadamente 70% dos cromossomos de fibrocísticos brancos europeus (11, 13). Entretanto a freqüência relativa da mutação  $\Delta F508$  tem uma variabilidade muito grande entre diferentes regiões geográficas e distintos grupos étnicos.

Por outro lado, a despeito dos vigorosos tratamentos antimicrobianos e da terapia física, a FC ainda é uma doença letal, cuja expectativa de sobrevivência, até poucos anos atrás, variava entre 25 e 30 anos (6, 12, 19). Abordagens clínicas e moleculares se combinam com a finalidade de atingir uma melhor compreensão da fisiopatologia e da bioquímica da FC, com vistas ao desenvolvimento de um tratamento que recupere a expressão correta do gene ou que regule o sistema de transporte de íons. Embora grandes avanços tenham sido alcançados, o tratamento da FC através da terapia genética é ainda virtual, e o tratamento pré-sintomático, com o fim de adiar as infecções pulmonares, bem como controlar as deficiências enzimáticas, ainda é o mais indicado (1, 18).

O diagnóstico precoce tem se mostrado um fator determinante na eficácia do tratamento, contribuindo para melhorar a qualidade de vida e a sobrevida do paciente. O diagnóstico da fibrose cística se baseia em achados clínicos clássicos, ou seja, manifestações pulmonares e/ou gastrintestinais típicas, história de casos de FC na família e demonstração de níveis elevados de sódio e de cloro no suor (teste do suor). O método padrão para o teste do suor (TS) consiste na estimulação da produção de suor pela pilocarpina, que é colocada sobre a pele ou diretamente nas glândulas sudoríparas, usando-se um gradiente de potencial (iontoforese) e análise da concentração dos íons sódio e cloro (8).

O diagnóstico molecular se baseia na análise das mutações, cuja maioria é particular em populações específicas ou grupos étnicos, fator que contribui para a diminuição da sensibilidade de detecção como um método de diagnóstico de rotina, uma vez que a análise molecular é baseada nas mutações mais comuns em populações europeias. Em função disso é aconselhável que seja analisado o maior número de mutações disponíveis, levando-se em conta o perfil mutacional de cada população (19).

O rastreamento neonatal tem sido assunto de discussão e um dilema na comunidade médica nos últimos dez anos. Porém, como o diagnóstico e o tratamento sintomático precoce influem no prognóstico final, parece lógica a realização do rastreamento neonatal, que foi recentemente recomendado pelo Ministério da Saúde através da dosagem da tripsina imunorreativa (IRT).

A dosagem IRT, por ser um teste de rastreamento populacional, foi padronizada a partir de amostra eluída de sangue coletado em papel-filtro (Guthrie card). O precursor (IRT) da enzima pancreática, tripsinogênio, encontra-se elevado em recém-nascidos com fibrose cística (4). Porém o IRT tem suscitado muitas controvérsias devido às taxas de falso-positivos (0,5%) e falso-negativos (até 20%), além de ter a desvantagem de que a concentração do tripsinogênio começa a declinar em poucas semanas após o nascimento, tornando-se um método de diagnóstico restrito aos dois primeiros meses de vida (9, 17).

A acuidade do rastreamento neonatal pelo teste de IRT pode ser aumentada, combinando-se a este a genotipagem naqueles recém-nascidos que apresentarem IRT alterada, de maneira a identificar pelo menos a mutação mais comum, a  $\Delta F508$ .

O presente trabalho tem como objetivo mostrar a eficácia da análise molecular da mutação mais freqüente na fibrose cística ( $\Delta F508$ ) em indivíduos com IRT alterada.

## Material e métodos

### Amostras

Este trabalho foi realizado como um estudo colaborativo entre o Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, e o Laboratório do Centro de Diagnóstico e Pesquisa Dr. Raymundo Britto, Apae/Rio.

Amostras de sangue fixadas em papel-filtro (Guthrie cards) de sete recém-nascidos com IRT alterada (níveis > 140ng/ml) foram enviadas pela Apae/Rio para a

análise molecular do DNA entre os anos de 1996 e 1998, de um total de 3.850 testes de IRT.

Amostras de sangue fixadas em Guthrie cards de 117 recém-nascidos (quatro a seis dias de vida) sem dados prévios de IRT foram genotipadas e posteriormente enviadas à Apae/Rio para dosagem de IRT.

#### Dosagem de IRT

A dosagem de IRT neonatal foi realizada de acordo com o protocolo descrito no *kit* Delfia® (Wallac-EG & G Co.), com metodologia imunofluorimétrica. Foram utilizados picotes de 3mm de mancha de sangue fixada em papel-filtro. Os picotes foram colocados em microplacas, aos quais foi adicionado o tampão de teste, e incubados durante a noite entre 2°C e 8°C. Após o período de incubação, foi acrescentada uma solução intensificadora.

O teste Delfia de IRT neonatal é um ensaio de dois sítios imunofluorimétricos de fase sólida. A reação se baseia na técnica de *sanduíche direto*, na qual dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra dois determinantes antigênicos separados na molécula de IRT. As amostras de sangue contendo IRT reagem simultaneamente com anticorpos monoclonais imobilizados em fase sólida (dirigidos contra um sítio antigênico específico na molécula de IRT) e anticorpos monoclonais marcados com európio contidos no tampão de teste (dirigidos contra outro sítio específico diferente). A solução intensificadora (*enhancement solution*) dissocia os íons európio dos anticorpos marcados em solução e formam quelatos altamente fluorescentes. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração de IRT na amostra.

Determinação do alelo mutante  $\Delta F508$  através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Raskin *et al.* (14), onde 1mm<sup>2</sup> das manchas de sangue fixadas no papel-filtro foi cortado, colocado em tubos de PCR previamente identificados, a estes se adicionando 50ml de mistura de reação contendo 200mM de dNTPs, tampão Tris-HCl 10mM, pH 8,8; KCl 50mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 8mg de BSA e 200ng de oligonucleotídeos iniciadores (3). A seguir a reação foi submetida a uma etapa de três ciclos de 96°C/64°C (três minutos por etapa), em um ciclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). Após estes ciclos, foi adicionada a cada um dos tubos 1,25U de Taq DNA polimerase e os mesmos foram submetidos ao protocolo de amplificação que consiste em 33 ciclos de 94°C/60 segundos; 64°C/30 segundos e 72°C/60 segundos.

As amostras amplificadas foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poli(acrilamida vertical a 15%, com tampão TBE (Tris-Borato 89mM em EDTA 2mM, pH 8), a 150V por 22 horas, para a identificação do alelo mutante  $\Delta F508$ . Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado sob exposição em luz ultravioleta.

## Resultados

No presente trabalho foi observado que, das 117 amostras de papel-filtro de recém-nascidos sem dados prévios de IRT, cinco delas não apresentaram amplificação. Entre as 112 que amplificaram foi encontrado apenas um indivíduo portador do alelo  $\Delta F508$ , ou seja, um heterozigoto  $\Delta F508$ /não- $\Delta F508$ . Após a dosagem de IRT foi observado que 111 indivíduos apresentavam concentrações de IRT normais, abaixo de 65ng/ml, inclusive o recém-nascido heterozigoto, para a mutação  $\Delta F508$ , cuja concentração de IRT foi de 4,44ng/ml. Entre os recém-nascidos que eram negativos para a mutação  $\Delta F508$  havia um com a concentração de IRT igual a 410,7ng/ml, valor muito acima do nível esperado de 140ng/ml. Na Tabela são apresentados os resultados do teste de IRT dos 117 recém-nascidos. A partir destes dados foram calculados o desvio padrão e a média, com e sem o valor de IRT alterado. Os resultados mostraram-se significativamente diferentes quando o recém-nascido com IRT alterada era considerado pertencente à amostra ( $n = 117$ , média = 8,207, DP = 38,101;  $n = 116$ , média = 4,737, DP = 6,597). No entanto a amostra mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg no que diz respeito ao *locus* FC ( $\chi^2 = 2,74$  gl = 2).

Por outro lado, entre os oito indivíduos rastreados pelo teste de IRT e cuja concentração foi superior a 140ng/ml, observamos que cinco eram portadores do alelo  $\Delta F508$ , sendo dois homozigotos mutantes ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) e três heterozigotos  $\Delta F508$ /não- $\Delta F508$ . Os outros três eram homozigotos não- $\Delta F508$ /não- $\Delta F508$  (Figura). Estes resultados mostram que a deleção está presente em 62,25% dos indivíduos analisados com concentração de IRT aumentada.

## Discussão

À primeira vista, os resultados encontrados, ou seja, oito indivíduos com IRT superior a 140ng/ml – dois homozigotos mutantes ( $\Delta F508/\Delta F508$ ), três heterozigotos

Tabela

## Concentração de IRT em amostra de 117 recém-nascidos (ng/ml)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	66,73	9,7	1,66	1,25	3,06	2,08	1,69	3,11
2	4,68	0,49	5,74	1,86	0,27	3,45	1,21	14,53
3	2,52	4,59	2,31	8,4	3,57	0,57	6,06	4,96
4	2,15	2,16	0,55	3,7	2,79	3,91	0,19	2,61
5	5,81	1,57	6,43	5,19	3,26	<b>410,7</b>	8,22	1,45
6	4,06	3,97	3	1,82	0,96	3,21	2,11	2,76
7	2,22	2,79	5,57	2,41	1,87	0,75	1,49	0,89
8	1,54	3,16	1,68	3,79	1,69	4,4	2,45	0,37
9	3,71	2,99	2	4,57	2,27	1,42	1,97	4,8
10	9,54	3,31	5,02	2,66	5,38	2,32	3,13	3
11	3,47	5,87	3,56	2,33	6,34	2,98	6,76	7,04
12	9,08	2,86	7,6	6,83	5,94	8,04	4,34	<b>4,44</b>
13	5,97	21,24	5,35	5,65	3,79	2,41	8,97	21,59
14	5,73	3,45	2,42	3,98	7,92	64,56	3,61	4,44
15	4,69	3	6,11	3,16	3,13	16,09		

A amostra 1-A é controle da Apae. Cada recém-nascido é codificado por um número e uma letra. Por exemplo, o valor da concentração de IRT do recém-nascido 5-F é de 410,7.

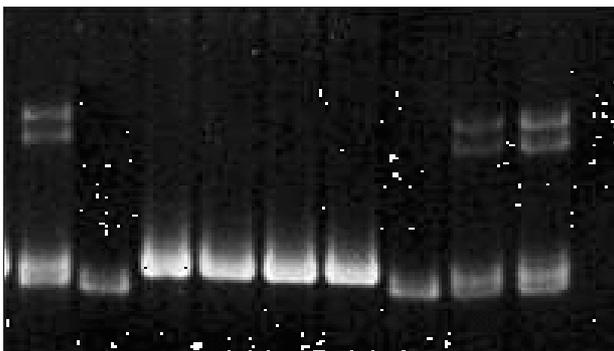


Figura - Gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio mostrando oito neonatos rastreados pelo teste de IRT. Da esquerda para a direita: poços 2 e 7 - homozigotos  $\Delta F508$ ; poços 1, 8 e 9 - heterozigotos  $\Delta F508$ /não- $\Delta F508$ ; poços 3 e 4 - homozigotos não- $\Delta F508$ ; poço 6 - controle normal sem teste de IRT

$\Delta F508$ /não- $\Delta F508$  e três homozigotos não- $\Delta F508$ /não- $\Delta F508$  -, parecem invalidar a triagem molecular de crianças fibrocísticas detectadas pelo teste do tripsinogênio. Mas se levarmos em conta o número de indivíduos que fizeram parte da amostra, o tamanho da amostra de recém-nascidos com IRT alterada é muito pequeno para que se faça alguma análise estatística sobre ele. No entanto estes mesmos resultados nos permitem tecer algumas considerações importantes no sentido de melhorar a eficiência da análise molecular do gene da fibrose cística em recém-nascidos com IRT alterada.

Inicialmente, consideremos os falso-positivos. Crianças que apresentem valores superiores a 140ng/ml, ou seja, com teste de IRT positivo prévio, deveriam ser reconvo-

cadas para um novo teste, antes de completar dois meses, para a eliminação dos falso-positivos que se mostrariam com dosagem normal de IRT na segunda avaliação. Resultados negativos para a mutação  $\Delta F508$  não excluem o diagnóstico da fibrose cística, uma vez que o teste molecular empregado é específico para uma única mutação e no gene da fibrose cística já foram identificadas mais de mil outras, a maioria delas muito rara ou própria de alguns grupos étnicos. Estudos de mutações individuais revelam que existe uma forte associação entre o genótipo da fibrose cística e a função pancreática. Isto é, algumas mutações consideradas severas, como, por exemplo, as mutações  $\Delta F508$ , G542X, R553X, W1282X, em homozigose ou combinadas, predispõem à insuficiência pancreática, enquanto outras, consideradas brandas, conferem à proteína CFTR uma atividade residual de forma a manter o pâncreas funcional. Assim, os resultados negativos para  $\Delta F508$  com IRT realmente positiva devem ser considerados com cautela.

Em segundo lugar, deve-se levar em conta a alta incidência de falso-negativos para o teste de IRT. Sabe-se que os falso-negativos em geral são devidos a erro de laboratório (eluição da amostra de sangue do papel-filtro pouco eficiente), a mudança de procedimentos (uso de *cut-off* muito alto) ou a fatores biológicos (iliomeconial ou outra condição envolvendo obstrução intestinal que parece favorecer a alta incidência de IRT falso-negativo). O grande

problema do falso-negativo é que ele não será detectado no teste de IRT e escapará à triagem molecular. A incidência de falso-negativos pode ser diminuída grandemente se estes fatores não forem negligenciados.

Em relação aos resultados da análise das 117 amostras coletadas em papel-filtro para o rastreamento bioquímico de neonatos, devemos lembrar que a amostra foi escolhida aleatoriamente, sem IRT prévio e sem nenhum dado clínico. Entre os 112 testados, um dos recém-nascidos (5-F) é um provável falso-positivo ou portador de uma mutação diferente da estudada, uma vez que ele tem IRT elevada (410,70ng/ml) e não apresenta a mutação  $\Delta F508$ . O outro recém-nascido (12-H) heterozigoto  $\Delta F508/N$  apresenta o valor de IRT normal (4,44ng/ml), tanto podendo ser um caso de IRT falso-negativo como um portador normal. Indivíduos portadores normais são aqueles que carregam o alelo mutante em apenas um dos cromossomos e são heterozigotos não-fibroscísticos. Estes não apresentam teste de IRT alterado, mas podem ser detectados no teste de DNA.

A partir das considerações acima podemos dizer que o método de rastreamento neonatal, combinando a triagem prévia pela dosagem de IRT e a análise molecular do gene da fibrose cística, somente será eficiente quando, excluídos

os fatores que determinam os falso-negativos e falso-positivos, forem realizadas análises adicionais que permitam a detecção de outras mutações do gene CFTR naquelas crianças cujos resultados sejam duvidosos. A necessidade deste tipo de abordagem é consequência da baixa frequência da mutação  $\Delta F508$  observada entre pacientes fibroscísticos no Rio de Janeiro, que é de apenas 26,58% (2, 3), permanecendo, portanto, aproximadamente 73% dos alelos mutantes FC não-caracterizados.

Para se planejar o rastreamento neonatal da FC, deve-se levar em conta o custo/benefício do programa, considerando-se fatores como rapidez, simplicidade, eficiência e baixo custo. Além disso, ele deve oferecer a possibilidade de determinar a incidência da doença em casos em que se acredite que a mesma está sendo subdiagnosticada, e principalmente possibilitar o tratamento precoce, que é o principal fator para um prognóstico favorável do fibroscístico.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz (Papes/Fiocruz) pelo suporte financeiro.

## Referências

1. Alton, E. *et al.* New treatments for cystic fibrosis. *Brit. Med. Bull.*, 48(4): 805-22, 1992.
2. Cabello, G.M.K. *et al.* Cystic fibrosis: low frequency of  $\Delta F508$  mutation in two population sample from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum. Biol.*, 7(2): 189-96, 1999.
3. Cabello, G.M.K. *et al.* The 3120+1G→A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian cystic fibrosis patients. *Hum. Biol.* 73(3): 403-9, 2001.
4. Crossley, J.R.; Elliott, R.B. & Smith, P.A. Dried blood spot screening for cystic fibrosis in newborn. *Lancet*, i: 472-4, 1979.
5. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic fibrosis mutation data online: [www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/), 1999.
6. Dean, M. & Santis, G. Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Hum. Genet.*, 93: 364-8, 1994.
7. Estivill, X. *et al.* Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum. Mutat.*, 10:135-54, 1997.
8. Gibson, L.E. & Cooke, R.E. A teste for concentration of electrolytes in cystic fibrosis using pilocarpine by electrophoresis. *Pediatrics*, 23: 545-9, 1959.
9. Hammond, K.B. *et al.* Efficacy of statewide neonatal screening for cystic fibrosis by assay of tripsinogen concentrations. *N. Engl. J. Med.*, 325(11): 769-74, 1991.
10. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245: 1073-80, 1989.
11. Kerem, E. *et al.* The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation ( $\Delta F508$ ). *N. Engl. J. Med.*, 323: 1517-22, 1990.
12. Koch, C. & Hoiby, N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*, 341:1065-9, 1993.
13. Lemna, W.K. *et al.* Mutation analysis for heterozygote detection and prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.*, 322: 291-6, 1990.
14. Raskin, S. *et al.* DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie Cards. *Am. J. Med. Genet.*, 46: 665-9, 1993.

15. Riordan, J.R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-73, 1989.
16. Romens, J.M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245: 1059-65, 1989.
17. Ryley, H.C.; Goodchild, M.C. & Dodge, J.A. Screening for cystic fibrosis. *Brit. Med. Bull.*, 48(4): 805-22, 1992.
18. Wagner, J.A. & Gardner, P. Toward cystic fibrosis gene therapy. *Ann. Rev. Med.*, 48: 203-16, 1997.
19. Welsh, M.J. *et al.* Cystic fibrosis. In: Scriver *et al.* (eds.). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 3: 3799-876, 1995.

---

**Endereço para correspondência**

Giselda M.K. Cabello  
Depto. Genética – Lab. Genética Humana  
do Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil 4.365 – Manguinhos  
CEP 21045-900 – Rio de Janeiro-RJ  
Tel.: (21) 2598-4358  
Fax: (21) 2260-4282  
e-mail: gkalli@ioc.fiocruz.br