

## Pesquisa da mutação F508del como primeiro passo no diagnóstico molecular de fibrose cística\*

Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis

Fernando Augusto de Lima Marson, Carmen Silvia Bertuzzo,  
Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro, Antônio Fernando Ribeiro,  
José Dirceu Ribeiro

### Resumo

**Objetivo:** Verificar a importância da detecção da mutação F508del no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* como primeiro passo no diagnóstico genético de fibrose cística (FC), associando-se o genótipo com várias variáveis clínicas. **Métodos:** Foram avaliados 180 pacientes com FC quanto à mutação F508del. As variáveis clínicas foram obtidas dos prontuários médicos dos pacientes e de entrevistas com seus pais ou responsáveis. **Resultados:** Dos 180 pacientes estudados, 65 (36,1%) não apresentavam a mutação F508del (grupo 0 [G0]), 67 (37,2%) eram heterozigotos (grupo 1 [G1]), e 48 (26,7%) eram homozigotos (grupo 2 [G2]). Todos os três grupos mostraram associações com as variáveis clínicas. A homozigose associou-se a pacientes mais jovens, menor idade ao diagnóstico e menor idade no primeiro isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* (PA), bem como maior prevalência de insuficiência pancreática (IP) e colonização por PA não mucoide (PANM). Na comparação com os pacientes G1+G2, os pacientes G0 eram mais velhos, com início de sintomas clínicos, doença digestiva e doença pulmonar mais tardio, diagnóstico tardio, PA isolada tardiamente, e menor prevalência de IP, íleo meconial e colonização por PANM, PA mucoide e *Burkholderia cepacia*. Nos pacientes G1, os valores foram intermediários para idade ao diagnóstico, idade no primeiro isolamento de PA, idade no início de doença pulmonar e de manifestações clínicas, colonização por PAM e OR para IP. **Conclusões:** A identificação de F508del em 63,9% dos pacientes estudados mostrou que ela pode ser uma ferramenta útil como primeiro passo no diagnóstico genético de FC. O genótipo F508del foi associado à gravidade clínica da doença, particularmente às variáveis relacionadas com o início da doença.

**Descritores:** Fibrose cística; Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística; Genótipo; Mutação.

### Abstract

**Objective:** To determine the relevance of screening for the F508del mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a first step in the genetic diagnosis of cystic fibrosis (CF) by associating the genotype with various clinical variables. **Methods:** We evaluated 180 CF patients regarding the F508del mutation. The clinical data were obtained from the medical records of the patients and from interviews with their parents or legal guardians. **Results:** Of the 180 patients studied, 65 (36.1%) did not carry the F508del mutation (group 0 [G0]), 67 (37.2%) were F508del heterozygous (G1), and 48 (26.7%) were F508del homozygous (G2). All three groups showed associations with the clinical variables. Homozygosity was associated with younger patients, younger age at CF diagnosis, and younger age at the first isolation of *Pseudomonas aeruginosa* (PA), as well as with higher prevalence of pancreatic insufficiency (PI) and non-mucoid PA (NMPA) colonization. In comparison with G1+G2 patients, G0 patients were older; first experienced clinical symptoms, digestive disease, and pulmonary disease at an older age; were older at CF diagnosis and at first PA isolation; and had a lower prevalence of PI and meconium ileus, as well as of colonization by NMPA, mucoid PA, and *Burkholderia cepacia*. In G1 patients, values were intermediate for age at CF diagnosis; age at first PA isolation, first pulmonary symptoms, and first clinical manifestations; MPA colonization; and OR for PI. **Conclusions:** The identification of F508del in 63.9% of the patients studied showed that this can be a useful tool as a first step in the genetic diagnosis of CF. The F508del genotype was associated with clinical severity of the disease, especially with the variables related to CF onset.

**Keywords:** Cystic Fibrosis; Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; Genotype; Mutation.

\* Trabalho realizado no Departamento de Pediatria, no Laboratório de Genética Molecular e no Laboratório de Fisiologia Pulmonar do Centro de Investigação em Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil. Endereço para correspondência: Fernando Augusto de Lima Marson. Department of Pediatrics, State University at Campinas School of Medical Sciences, CEP 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brasil. Tel. 55 19 3521-8902. E-mail: fernandolimamarson@hotmail.com

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Recebido para publicação em 16/11/2012. Aprovado, após revisão, em 15/2/2013.

## Introdução

A fibrose cística (FC) é a doença genética letal mais comum na infância em populações caucasianas.<sup>(1)</sup> A doença é causada por mutações do gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*, regulador de condutância transmembrana da fibrose cística), que codifica a proteína de mesmo nome.<sup>(2-4)</sup> Cerca de 2.000 mutações causadoras de doenças foram encontradas no gene *CFTR*.<sup>(5)</sup> Essas mutações são classificadas em seis classes de acordo com a ausência de alterações ou alterações qualitativas e quantitativas na proteína *CFTR*.<sup>(6)</sup>

A mais comum mutação do gene *CFTR* é uma deleção de três nucleotídeos que resulta na ausência do aminoácido 508 da proteína *CFTR*, que normalmente tem 1,480 aminoácidos. Essa mutação, a qual falta um único códon de fenilalanina, é comumente designada F508del (c.1521\_1523delCTT para se referir à mutação do DNA e F508del para se referir à proteína mutante). Em todo o mundo, a principal mutação do gene *CFTR* é a F508del, cuja prevalência varia de 30% a 80%. Em populações caucasianas, a mutação F508del é encontrada em aproximadamente 70-88% dos alelos em pacientes com FC.<sup>(5,7)</sup> Os demais 12-30% dos alelos compreendem as outras 2.000 diferentes mutações, cada qual apresenta, individualmente, uma frequência muito baixa (poucas mutações apresentam frequência acima de 0,1% em todo o mundo, mas algumas podem apresentar elevada prevalência em populações selecionadas).<sup>(5,8,9)</sup>

A variabilidade da gravidade da FC está associada principalmente a fatores genéticos, tais como genes modificadores e classes de mutações do gene *CFTR*, bem como a fatores ambientais.<sup>(9-15)</sup> A mutação F508del é uma mutação classe II (que resulta em proteínas *CFTR* dobradas/processadas incorretamente) e está associada a FC de maior gravidade clínica.<sup>(9)</sup>

Na maioria dos países, atualmente não é possível identificar todo o espectro de mutações do gene *CFTR*. Juntamente à triagem neonatal que utiliza o teste de tripsinogênio imunorreativo, o sistema público de saúde brasileiro tem atualmente auxiliado na investigação de mutações do gene *CFTR*. No entanto, por causa dos custos, apenas uma mutação é investigada. Portanto, estudos sobre a investigação da mutação F508del são necessários e importantes, pois se trata do único teste que pode ser realizado atualmente na maioria

dos países. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a importância da investigação da mutação F508del como primeiro passo para o diagnóstico genético de FC, associando-se o genótipo F508del a 28 variáveis clínicas.

## Métodos

Trata-se de um estudo transversal realizado em um centro universitário de FC entre 2010 e 2011. O diagnóstico de FC foi confirmado por duas dosagens de sódio e cloro no suor (concentrações > 60 mEq/L) em todos os pacientes. Foram selecionados 215 pacientes para o estudo. Desses, 35 foram excluídos porque faltavam dados clínicos ou porque o termo de consentimento livre e esclarecido não havia sido assinado.

Usamos o método do fenol/clorofórmio para a extração do DNA, e, em todas as análises genéticas, a concentração do DNA foi de 50 ng/mL, determinada por meio de um espectrofotômetro (NanoVue™; GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA).

A presença da mutação F508del foi determinada por meio de PCR com um par de iniciadores – sentido (5'-GGC ACC ATT AAA GAA AAT ATC-3') e antissenso (5'-TGG CAT GCT TTG ATG ACG C-3') – resultando em um fragmento de 74 pb (homozigose para F508del), um fragmento de 77 pb (ausência de F508del) ou presença de ambos os fragmentos (heterozigose para F508del). O procedimento de ciclagem térmica consistiu em desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguida de desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 53,5°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 1 min, repetidos durante 35 ciclos e seguidos de uma extensão final a 72°C durante 10 min. A PCR continha 25 µL de uma solução com 50 ng de DNA, 1 µM de cada iniciador, 200 µM de dNTP, 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4 a 25°C) e 1,5 U de Taq DNA polimerase. Após a adição de 5 µL de tampão de carga à base de glicerol, 10 µL do produto da reação foram aplicados sobre gel de acrilamida.<sup>(16)</sup>

A presença de mutações do gene *CFTR* foi determinada no laboratório de genética molecular da instituição por meio do método RFLP (G542X, R1162X, R553X, G551D e N1303K). Algumas mutações foram obtidas por sequenciamento ou *multiplex ligation-dependent probe amplification*: S4X, 2183A>G, 1717-G>A e I618T. Para ambos os métodos, usamos o sequenciador de DNA MegaBace1000 (GE Healthcare Biosciences).<sup>(16)</sup>

Foram coletados dados clínicos e variáveis antropométricas, além de resultados de função pulmonar e de cultura de escarro ou *swab* de orofaringe.

Foram investigadas as seguintes variáveis clínicas: escores clínicos (escore de Shwachman-Kulczycki, Kanga e Bhalla)<sup>(17)</sup>; índice de massa corporal (IMC) – para os pacientes com mais de 19 anos, usamos a fórmula  $IMC = \text{peso}/(\text{altura})^2$ ; para os demais pacientes, usamos WHO Anthro, versão 3.0.1, e WHO Anthro Plus, versão 1.0.2, respectivamente, para crianças com menos de 5 anos de idade e para aqueles com 5–19 anos de idade; idade (dicotomizada em  $\leq 154$  meses e  $> 154$  meses); idade no momento do diagnóstico (dicotomizada em  $\leq 24$  meses e  $> 24$  meses); idade no momento em que apareceram os primeiros sintomas digestivos (dicotomizada em  $\leq 3$  meses e  $> 3$  meses); idade no momento em que apareceram os primeiros sintomas pulmonares (dicotomizada em  $\leq 6$  meses e  $> 6$  meses); idade no momento em que *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada pela primeira vez (dicotomizada em  $\leq 30$  meses e  $> 30$  meses); colonização das vias aéreas (*P. aeruginosa* mucoide [PAM], *P. aeruginosa* não mucoide [PANM], *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia* e *Staphylococcus aureus*); SaO<sub>2</sub> transcutânea; resultados de espirometria; comorbidades – pólipos nasais, osteoporose, ileo meconial (IM), diabetes mellitus e insuficiência pancreática (IP).

Todos os escores foram determinados por dois pneumologistas pediátricos, e, em caso de discordância, um terceiro especialista era convidado a analisar os escores para determinar os resultados finais.

Todos os pacientes com idade  $\geq 7$  anos foram submetidos a espirometria com um espirômetro CPFS/D (MedGraphics, Saint Paul, MN, EUA). Os dados foram registrados por meio do programa Breeze PF, versão 3.8B para Windows 95/98/NT (Medical Graphics Corp., Saint Paul, MN, EUA), e foram incluídas as seguintes variáveis: CVF, em % do previsto; VEF<sub>1</sub>, em % do previsto; relação VEF<sub>1</sub>/CVF, em % do previsto; FEF<sub>25-75%</sub>.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 528/2008).

Para fins de análise estatística, as variáveis que não apresentaram distribuição normal (idade no momento do diagnóstico, idade no

momento em que surgiram os primeiros sintomas pulmonares e digestivos e idade no momento em que *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez) foram divididas em dois grupos; para tal, o valor mediano de cada variável foi usado como ponto de corte. Os dados categorizados pela mediana foram divididos em duas coortes de tamanho amostral semelhante.

Para a avaliação clínica dos escores, da SaO<sub>2</sub> e dos testes espirométricos, as análises foram realizadas sem ajustar os dados.

As bactérias isoladas das vias aéreas dos pacientes foram usadas como marcadores de acordo com a presença ou ausência de bactérias específicas em três culturas consecutivas no ano anterior.

As comorbidades foram comparadas quanto a sua presença ou ausência.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

A fim de evitar dados espúrios em virtude do problema de testes múltiplos,<sup>(18)</sup> o nível de significância  $\alpha$  foi ajustado pela correção de Bonferroni para três grupos: G0, sem a mutação F508del (pacientes sem F508del nos dois alelos ou aqueles cuja mutação do gene *CFTR* não pôde ser determinada); G1, mutação F508del heterozigótica (pacientes com a mutação F508del em um dos alelos, com ou sem outra mutação do gene *CFTR*) e G2, mutação F508del homozigótica (pacientes com F508del em ambos os alelos).

O poder estatístico da amostra foi calculado com o programa gratuito G\*Power, versão 3.0.5,<sup>(19)</sup> que mostrou um poder estatístico superior a 80% para a análise realizada e  $\alpha = 0,05$  com uma população de 159 pacientes com FC.

Os dados foram comparados por meio de ANOVA para um fator, teste de Kruskal-Wallis, teste U de Mann-Whitney e teste do qui-quadrado de Pearson. Para as comparações entre os genótipos e as variáveis com distribuição numérica, o teste de Kruskal-Wallis foi usado para genótipos F508del, e o teste de Mann-Whitney foi usado para os grupos F508del. Para as variáveis categóricas, usamos o teste do qui-quadrado de Pearson e ORs.

## Resultados

Os dados numéricos e categóricos das variáveis clínicas em 180 pacientes com FC são apresentados na Tabela 1. A distribuição dos pacientes nos grupos (G0, G1 e G2) foi de 65 (36,1%), 67 (37,2%)

**Tabela 1** – Características dos pacientes incluídos no estudo (n = 180).<sup>a</sup>

Variável	Resultado
Homens	50,00
Idade, anos	17,72 ± 15,75 (0,60-24,00)
Caucasóides	91,70
Peso baixo e peso extremamente baixo	22,47
Identificação de um alelo F508del	37,20
Identificação de dois alelos F508del	26,70
Idade no momento das primeiras manifestações clínicas, anos	2,90 ± 8,88 (0,00-13,00)
Idade no momento do diagnóstico, anos	7,62 ± 13,63 (0,00-14,23)
Idade no momento dos primeiros sintomas digestivos, anos	3,39 ± 9,11 (0,00-12,45)
Idade no momento dos sintomas pulmonares, anos	2,90 ± 9,89 (0,00-13,00)
SaO <sub>2</sub> , %	94,92 ± 4,26 (66,00-99,00)
Escore de Bhalla	8,74 ± 5,72 (0,00-25,00)
Escore de Kanga	18,85 ± 5,84 (10,00-40,00)
Escore de Shwachman-Kulczycki	65,85 ± 16,77 (20,00-95,00)
CVF, % do previsto	79,29 ± 23,55 (19,00-135,00)
VEF <sub>1</sub> , % do previsto	71,29 ± 27,47 (17,00-132,00)
VEF <sub>1</sub> /CVF, % do previsto	83,46 ± 15,95 (37,00-137,00)
FEF <sub>25-75%</sub>	59,05 ± 35,55 (7,00-150,00)
Pólipos nasais	18,64
Diabetes mellitus	18,64
Osteoporose	16,38
Insuficiência pancreática	79,90
Íleo meconial	15,08
Idade no momento do primeiro isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , anos	8,55 ± 14,45 (2,00-15,00)
Colonização <sup>b</sup>	
<i>P. aeruginosa</i>	56,42
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	42,46
<i>Burkholderia cepacia</i>	13,97
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	10,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	78,77

<sup>a</sup>Valores expressos em % ou média ± dp (variação). <sup>b</sup>Colonização positiva baseada em três culturas respiratórias positivas consecutivas no ano anterior.

e 48 (26,7%), respectivamente. Constatamos que a população não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg no tocante à mutação F508del ( $p < 0,001$ ). A distribuição dos pacientes de acordo com o genótipo de mutação do gene *CFTR* é mostrada na Tabela 2.

A respeito das variáveis numéricas, a SaO<sub>2</sub> e o escore de Shwachman-Kulczycki foram significativamente maiores no G1 e no G2 do que no G0 ( $p = 0,034$  e  $p = 0,046$ , respectivamente; Tabela 3).

A respeito das variáveis categóricas clínicas, os pacientes do G2 associaram-se a menor idade em geral ( $p \leq 0,001$ ), menor idade no momento do diagnóstico de FC ( $p < 0,001$ ), menor idade no momento em que *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez ( $p = 0,009$ ) e maior prevalência

de IP ( $p = 0,001$ ) e PANM ( $p = 0,025$ ; Tabela 4). Na comparação com os pacientes do G1+G2, os pacientes do G0 eram mais velhos ( $p < 0,001$ ), eram mais velhos quando apresentaram os primeiros sintomas clínicos ( $p < 0,001$ ), eram mais velhos quando apresentaram doença digestiva ( $p = 0,023$ ), eram mais velhos quando apresentaram doença pulmonar ( $p = 0,006$ ), eram mais velhos no momento do diagnóstico de FC ( $p < 0,001$ ), apresentavam menor prevalência de IP ( $p < 0,001$ ), apresentavam menor prevalência de IM ( $p = 0,047$ ), eram mais velhos quando *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez ( $p = 0,001$ ) e apresentaram menor prevalência de colonização por PANM ( $p = 0,025$ ), PAM ( $p = 0,068$ ) e *B. cepacia* ( $p = 0,001$ ; Tabela 4). Foram encontrados valores intermediários nos pacientes do G1: idade no

**Tabela 2** - Genótipo *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* de acordo com o grupo de mutação F508del.

Grupo de mutação F508del	Genótipo de mutação do gene <i>CFTR</i>	n	Paciente			
			%	% por grupo		
G0	-/-	43	23,9	36,1		
	G542X/-	5	2,8			
	G542X/R1162X	1	0,6			
	G542X/I618T	1	0,6			
	G542X/2183A>G	1	0,6			
	G542X/2183AAaG	1	0,6			
	G542X/P205S	1	0,6			
	G542X/R334W	1	0,6			
	I507V/-	1	0,6			
	R334W/R1066C	1	0,6			
	R334W/R334W	1	0,6			
	3120+1G>A/3120+1G>A	1	0,6			
	3120+1G>A/-	1	0,6			
	TG11-5T/-	1	0,6			
	622-2A>G/711+1G>T	1	0,6			
	R1162X/R1162X	1	0,6			
	R1162X/-	1	0,6			
	D110H/V232H	1	0,6			
	G1	F508del/-	40		22,2	37,2
		F508del/G542X	13		7,2	
F508del/R1162X		5	2,8			
F508del/N1303K		4	2,2			
F508del/R553X		2	1,1			
F508del/S4X		1	0,6			
F508del/1717-1G>A		1	0,6			
F508del/duplicação do éxon 6B-16		1	0,6			
G2	F508del/2184insA	1	0,6	26,7		
	F508del/F508del	48	26,7			

G0: F508del ausente; G1: pacientes heterozigotos para F508del; e G2: pacientes homozigotos para F508del.

**Tabela 3** - Variáveis numéricas significativamente diferentes nos grupos estudados.\*

Variável	Grupo (genótipo)	Mediana	Média	dp	p
Escore de Shwachman-Kulczycki	G0	95	93,38	5,935	0,046
	G1+G2	96	95,50		
SaO <sub>2</sub>	G0	60	61,40	17,844	0,034
	G1+G2	65	67,91		

G0: F508del ausente; G1: pacientes heterozigotos para F508del; e G2: pacientes homozigotos para F508del.

\*Teste U de Mann-Whitney.

momento do diagnóstico de FC ( $p < 0,001$ ), idade no momento em que *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez ( $p = 0,001$ ), idade no momento em que ocorreram os primeiros sintomas pulmonares ( $p = 0,006$ ), idade no momento em que ocorreram as primeiras manifestações clínicas ( $p < 0,001$ ), colonização por PAM ( $p = 0,068$ ) e OR para IP ( $p < 0,001$ ).

A Tabela 5 mostra a associação das principais variáveis com o genótipo F508del.

## Discussão

O uso de genética molecular na prática clínica tem melhorado, e é considerado importante em vários aspectos relacionados à assistência ao paciente. A técnica molecular é essencial para o diagnóstico de FC, especialmente nos casos em que haja dúvidas, isto é, quando o paciente apresenta sintomas de FC não confirmados por testes de suor, quando os sintomas de FC

**Tabela 4** – Variáveis categóricas significativamente diferentes nos grupos estudados.\*

Grupo	Variável	Categorização	p	OR	IC95%	Variável	Categorização	p	OR	IC95%CI
G0 G1 G2	Idade	≤ 154 m	< 0,001	0,238	0,121-0,457	Idade nas primeiras manifestações clínicas	≤ 3 m	< 0,001	0,239	0,119-0,47
		> 154 m					> 3 m			
		18					46			
G0 G1 G2	Idade no diagnóstico	≤ 24 m	< 0,001	1,202	0,654-2,217	Idade na doença digestiva	≤ 3 m	0,023	0,362	0,165-0,77
		> 24 m					> 3 m			
		36					11			
G0 G1 G2	Idade na doença pulmonar	≤ 6 m	0,006	4,754	2,263-10,53	IP	Presença	< 0,001	1,852	0,958-3,615
		> 6 m					Ausência			
		20					32			
G0 G1 G2	IM	Presença	0,047	2,258	1,181-4,391	Idade no primeiro isolamento de PA	≤ 3 m	0,001	4,71	1,817-14,35
		Ausência					> 3 m			
		5					60			
G0 G1 G2	PAM	Presença	0,068	1,662	0,682-3,906	PANM	Presença	0,025	0,438	0,233-0,814
		Ausência					Ausência			
		21					44			
G0 G1 G2	BC	Presença	0,101	0,97	0,491-1,898		Presença	0,025	1,39	0,752-2,593
		Ausência					Ausência			
		4					61			
G0 G1 G2		Presença	0,101	1,83	0,757-4,426		Presença	0,025	1,82	0,916-3,702
		Ausência					Ausência			
		12					55			
G0 G1 G2		Presença	0,101	1,447	0,548-3,618		Presença	0,025	1,82	0,916-3,702
		Ausência					Ausência			
		8					40			

m: meses; G0: F508del ausente; G1: pacientes heterozigotos para F508del; G2: pacientes homozigotos para F508del; IM: íleo meconial; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; PAM: colonização por PA mucóide; BC: colonização por *Burkholderia cepacia*; IP: insuficiência pancreática; e PANM: colonização por PA não mucóide. \*Teste do qui-quadrado.

**Tabela 5** – Variáveis significativamente associadas ao genótipo *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* de acordo com os grupos de mutação F508del.\*

Variável clínica	Genótipo	G2 vs. G0+G1	G0 vs. G1+G2
	p	p	p
Sexo	0,473	0,400	1
Etnia	0,353	0,549	0,407
Idade	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Idade no momento das primeiras manifestações clínicas	< 0,001	0,394	< 0,001
Idade no momento do diagnóstico	< 0,001	0,001	0,01
Aparecimento de sintomas digestivos	0,022	0,602	< 0,001
Aparecimento de sintomas pulmonares	0,006	0,731	0,004
IMC	0,227	0,22	0,186
Escore de Bhalla	0,163	0,283	0,06
Escore de Kanga	0,509	0,466	0,264
Escore de Shwachman-Kulczycki	0,098	0,889	0,046
SaO <sub>2</sub>	0,068	0,076	0,034
CVF, % do previsto	0,514	0,368	0,29
VEF <sub>1</sub> , % do previsto	0,321	0,054	0,383
VEF <sub>1</sub> /CVF, % do previsto	0,49	0,232	0,596
FEF <sub>25-75%</sub>	0,29	0,27	0,132
Pólipos nasais	0,521	0,516	0,842
Diabetes mellitus	0,948	1	0,842
Osteoporose	0,236	0,255	0,139
Insuficiência pancreática	< 0,001	0,001	< 0,001
Íleo meconial	0,047	0,238	0,016
Primeiro isolamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,001	0,009	0,001
Colonização			
<i>P. aeruginosa</i>	0,025	0,092	0,012
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,068	1	0,059
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,332	0,46	0,04
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,101	0,261	0,301
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,758	1	0,572

G0: F508del ausente; G1: pacientes heterozigotos para F508del; G2: pacientes homozigotos para F508del; e IMC: índice de massa corporal. \*ANOVA de Kruskal-Wallis para um fator (dados numéricos) e qui-quadrado de Pearson (dados categóricos).

aparecem na vida adulta, em casos de FC atípica e quando a FC é causada por mutações do gene *CFTR* pertencentes à classe IV, V ou VI. Em pacientes com FC com variabilidade clínica, a análise genética pode melhorar a compreensão da doença e promover terapias específicas e melhor tratamento ambulatorial.

Os testes moleculares não estão disponíveis em nosso sistema público de saúde; no entanto, centros ligados a universidades investigam as principais mutações do gene *CFTR*. Dentre as mutações do gene *CFTR*, a investigação da mutação F508del é realizada rotineiramente em nosso centro de pesquisa em todos os pacientes com dois testes de sódio e cloro no suor com valores acima de 60 mEq/L. A investigação da mutação F508del não é cara e permite o diagnóstico definitivo em 26,7% dos pacientes em nosso centro, 37,2%

dos quais são identificados como heterozigotos. Nosso estudo mostrou que a identificação da mutação F508del é importante em um país com grande diversidade étnica, pois 63,9% de nossos pacientes apresentaram pelo menos um alelo F508del. Portanto, a investigação da mutação F508del no sistema público de saúde é necessária e deve ser implantada em todos os países em desenvolvimento. A identificação da mutação F508del permite melhor aconselhamento genético.

No estado de São Paulo, a triagem neonatal de FC por meio da dosagem do tripsinogênio imunorreativo é possível desde 2010. A triagem neonatal e a dosagem de cloro/sódio no suor são gratuitas para todos os pacientes. Nossa clínica recebe cerca de 30 dólares/paciente do governo para a investigação de mutações do gene *CFTR*. Esse valor nos permite realizar apenas a

investigação da mutação F508del. A identificação de mutações adicionais é feita por projetos de pesquisa financiados. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a importância da identificação da mutação F508del em nossos pacientes, em virtude da atual emenda para a triagem neonatal pública no Brasil, que fornece subsídios para a análise molecular a fim de identificar casos positivos em pacientes neonatais, bem como estudos sobre novas drogas para FC.

Em nosso estudo, foram analisadas 28 variáveis clínicas que foram associadas à mutação F508del. Associações com a mutação F508del foram encontradas principalmente nas variáveis relacionadas ao aparecimento da doença. Em nosso estudo, nenhum paciente foi diagnosticado por triagem neonatal. Portanto, a associação entre o genótipo F508del e as variáveis relacionadas ao aparecimento da doença, tais como a idade no momento em que surgiram os primeiros sintomas clínicos e a idade no momento do diagnóstico, deve estar relacionada com a gravidade clínica, e não com o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes.

Com a inclusão de um programa de triagem neonatal de FC no estado de São Paulo em 2010, a investigação da mutação F508del tornou-se importante como um meio de prever as manifestações clínicas da FC, permitindo melhor monitoramento dos pacientes em nossa clínica de saúde.

Os pacientes do G0 apresentaram um risco menor de manifestações clínicas precoces de FC e um fator protetor para algumas das variáveis estudadas (idade, idade no momento do diagnóstico de FC, primeiros sintomas clínicos, doenças digestivas e pulmonares, IM e idade no momento do primeiro isolamento de *P. aeruginosa*). Além disso, houve um fator de proteção contra colonização por PAM, PANM e *B. cepacia*, que é um importante fator de risco de doença pulmonar. Corroborando a literatura, IP foi menos comum no G0 do que em G1/G2 em nosso estudo.

Os pacientes do G2 eram mais jovens, eram mais jovens quando receberam o diagnóstico de FC, eram mais jovens quando *P. aeruginosa* foi isolada pela primeira vez e mais comumente receberam diagnóstico de IP.

Algumas das variáveis estudadas foram significativamente diferentes no G1 em relação ao G0 e ao G2 (idade no momento da primeira manifestação clínica, idade no momento do

início da doença pulmonar e colonização por PAM). Além disso, a IP e a idade no momento do diagnóstico de FC apresentaram resultados intermediários.

Na análise de agrupamentos de genes quanto às variáveis com dados numéricos, os pacientes do G1 e do G2 apresentaram SaO<sub>2</sub> e escores de Shwachman-Kulczycki significativamente maiores. Maiores valores para essas variáveis estão associados a doença menos grave; no entanto, esses pacientes eram mais jovens, e isso está associado à variação do escore de Shwachman-Kulczycki e da SaO<sub>2</sub>.

Ao medir os fatores de risco para sobrevivência em longo prazo em um grupo de pacientes com FC mais velhos (> 40 anos de idade), um grupo de autores relatou que a atividade residual da CFTR não foi um fator associado ao aumento da expectativa de vida, mas sim a outros fatores, como o IMC.<sup>(20)</sup> A maior importância da mutação F508del e de sua identificação está associada ao aparecimento da doença. No presente estudo, os marcadores de gravidade inicial da fisiopatologia associaram-se mais evidentemente ao genótipo F508del do que o fizeram outras variáveis clínicas.<sup>(20)</sup> Portanto, acreditamos que o genótipo tem maior importância no aparecimento da doença e que o ambiente progressivamente se torna um fator de risco maior à medida que a idade avança. Além disso, acreditamos que a seleção de sobrevivência esteja relacionada à classe da mutação do gene *CFTR*.

Outro fato que sublinha a importância da investigação da F508del é que essa mutação é a mais comumente estudada, e o uso de novas drogas tem se concentrado em pacientes com essa mutação, o que poderia favorecer seu tratamento. O estudo de corretores de F508del-CFTR depende do uso de cicerones farmacológicos que estabilizam a proteína em seu estado nativo, de células-alvo com reguladores de proteostase para aumentar a eficiência de dobragem da proteína ou de ambos ao mesmo tempo. Embora tenham sido criados corretores de estabilização e dobragem de F508del-CFTR, é preciso conhecer todo o mecanismo de ação dessas drogas antes de usá-las em nossa prática clínica. Os esforços atuais para identificar corretores, baseados em grande parte em investigações de fenótipos, não têm logrado êxito em identificar moléculas altamente eficientes.<sup>(21,22)</sup> Embora haja inúmeros defeitos na proteína CFTR, alguns deles podem



ser passíveis de correção. Novos tratamentos visam corrigir proteínas CFTR defeituosas.<sup>(22)</sup>

Apesar dos avanços no conhecimento científico sobre a FC, não se sabe muito sobre o manejo da doença, e ainda há muita controvérsia.<sup>(23)</sup> Ainda há muito que se aprender sobre o mecanismo que envolve a expressão da proteína CFTR associada à mutação F508del,<sup>(24)</sup> pois esta atua em múltiplas etapas da biogênese de CFTR.<sup>(25)</sup>

Atualmente, o estudo da variação genética da FC por meio de tecnologia molecular permite novas possibilidades terapêuticas e fornece conhecimento sobre os fatores desconhecidos da gravidade da doença.<sup>(9)</sup> Como a prevalência da mutação F508del é maior do que a de outras mutações do gene *CFTR* com importância clínica descrita, esse é o principal fator a ser analisado como primeiro passo para o diagnóstico molecular de FC. A análise das mutações em uma população predominantemente caucasiana pode melhorar o diagnóstico e o aconselhamento genético, propiciar o uso de novas drogas que ainda estão sendo estudadas e uma análise molecular menos cara, bem como melhor monitoramento e foco de pacientes ambulatoriais, além de promover o diagnóstico molecular em indivíduos com teste de triagem neonatal positivo para FC mesmo com o baixo subsídio fornecido. Deve haver uma compreensão e uma associação entre o ambulatório e o laboratório de pesquisa, a fim de melhorar o monitoramento dos pacientes.<sup>(8)</sup>

Atualmente, temos áreas prioritárias para o estudo da FC: explorar os mecanismos patogênicos da doença pulmonar precoce; melhorar a triagem neonatal; criar um espectro de biomarcadores de doença pulmonar precoce que reflitam a fisiopatologia, o curso clínico e a resposta ao tratamento; explorar o papel da genética/genômica na patogênese da doença; definir os eventos microbiológicos na doença pulmonar precoce e elucidar as alterações dos mecanismos de remodelação, inflamação, e reparo na doença pulmonar.<sup>(26)</sup> Ainda há muito a ser feito nesse contexto, e a identificação de uma mutação pontual pode trazer benefícios tão importantes como aqueles trazidos pela identificação de outras mutações do gene *CFTR*.

Em nosso estudo, realizamos uma análise univariada. Um modelo de regressão logística multivariada poderia ter sido usado; no entanto, seria necessária uma amostra maior de pacientes com FC para ajustar a idade e outros fatores

simultaneamente. Por exemplo, um paciente de 40 anos de idade é significativamente mais propenso a ser colonizado do que um paciente de 5 anos de idade. Em nosso estudo, analisamos diretamente a influência do genótipo F508del em pacientes com FC.

Há uma enorme diversidade étnica no Brasil, e, portanto, pode ser desvantajoso para alguns indivíduos ser testados apenas para F508del. No entanto, não surpreendentemente, nossos achados foram semelhantes aos da literatura, e a investigação de uma única mutação de FC foi capaz de demonstrar o diagnóstico genético em um terço dos pacientes. Outro terço dos pacientes apresentou pelo menos um alelo com essa mutação. A investigação da F508del é importante, particularmente em países em desenvolvimento e em países com recursos limitados.

Em conclusão, a identificação da mutação F508del e sua associação com a gravidade clínica da doença nos permitiram compreender melhor sua influência sobre as manifestações clínicas em pacientes com FC. A associação com variáveis relacionadas com o aparecimento da doença sublinha a importância da investigação dessa mutação no momento do diagnóstico e após a triagem neonatal positiva para FC. No futuro, o uso de novas drogas voltadas a um genótipo particular associar-se-á à análise molecular. Em virtude de sua elevada prevalência na população com FC, a F508del deve ser analisada primeiramente, principalmente em países em desenvolvimento. O aconselhamento genético de pais e pacientes é mais bem realizado quando se conhece a mutação associada à doença. O tratamento ambulatorial pode ser mais bem realizado, especialmente considerando a importância da F508del em associação com variáveis de gravidade da FC, tais como o isolamento de bactérias que causam infecção pulmonar crônica. Em suma, a identificação da mutação F508del promove o aconselhamento genético, o manejo, o monitoramento, o diagnóstico e o uso de novas drogas. Acreditamos que os laboratórios genéticos em todo o mundo deveriam inicialmente considerar a investigação da mutação F508del apenas em pacientes com dois testes de sódio/cloro no suor alterados.

## Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Luciana C Bonadia, Tais DR Hortêncio, Kátia CA Aguiar,

Aline Gonçalves, Simoni Avancini, Carlos E Levy, Patrícia Barbalho e Luciana M Rezende seu auxílio na coleta de dados e organização de ideias. Gostaríamos também de agradecer a Maria Julia Gonçalves de Oliveira Ribeiro seu auxílio na revisão do manuscrito em inglês.

## Referências

1. Cystic Fibrosis Trust [homepage on the Internet]. London: Cystic Fibrosis Trust [cited 2012 May 10]. Standards for the clinical care of children and adults with cystic fibrosis in the UK. [Adobe Acrobat document, 46p.]. Available from: [https://www.cysticfibrosis.org.uk/media/82070/CD\\_Standards\\_of\\_Care\\_Dec\\_11.pdf](https://www.cysticfibrosis.org.uk/media/82070/CD_Standards_of_Care_Dec_11.pdf)
2. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989;245(4922):1073-80. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2570460> PMID:2570460
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science*. 1989;245(4925):1437. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2475911> PMID:2475911
4. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989;245(4922):1059-65. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2772657> PMID:2772657
5. Cystic Fibrosis Mutation Database [homepage on the Internet]. Toronto: Cystic Fibrosis Consortium [cited 2012 Mar 06]. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
6. Culling B, Ogle R. Genetic counselling issues in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010;11(2):75-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2010.01.001> PMID:20416541
7. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2011 Annual Data Report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation; 2011.
8. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):179-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009> PMID:18456578 PMID:2810954
9. Drumm ML, Ziady AG, Davis PB. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:267-82. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-120900> PMID:22017581
10. Sebros R, Levy H, Schneck K, Dimmock D, Raby BA, Cannon CL, et al. Cystic fibrosis mutations for p.F508del compound heterozygotes predict sweat chloride levels and pancreatic sufficiency. *Clin Genet*. 2012;82(6):546-51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01804.x> PMID:22035343
11. Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR. Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function. *J Pediatr*. 2010;157(5):802-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.05.018> PMID:20580019 PMID:2948620
12. Faria EJ, Faria IC, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS. Association of MBL2, TGF-beta1 and CD14 gene polymorphisms with lung disease severity in cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35(4):334-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009000400007> PMID:19466271
13. Lima CS, Ortega MM, Marson FA, Zulli R, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and glutathione S-transferase null genotypes in cystic fibrosis patients in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2012;38(1):50-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132012000100008> PMID:22407040
14. Marson FA, Bertuzzo CS, Hortencio TD, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2012;12:41. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-12-41> <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-12-50>
15. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in ADRB2 gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2012;12:50. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-12-41> <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-12-50> PMID:22950544 PMID:3558405
16. Bonadia LC. Correlação entre aspectos clínicos, moleculares e fisiológicos de pacientes adultos com hipótese diagnóstica de fibrose cística de um centro de referência no Brasil [thesis]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2011.
17. Santos CI, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Hessel G. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado da arte. *J Bras Pneumol*. 2004;30(3):286-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132004000300016>
18. Drăghici S. Data analysis tools for DNA microarrays. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2003. <http://dx.doi.org/10.1201/9780203486078>
19. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175-91. <http://dx.doi.org/10.3758/BF03193146> PMID:17695343
20. Simmonds NJ, D'Souza L, Roughton M, Alton EW, Davies JC, Hodson ME. Cystic fibrosis and survival to 40 years: a study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *Eur Respir J*. 2011;37(5):1076-82. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00079010> PMID:20847077
21. Lukacs GL, Verkman AS. CFTR: folding, misfolding and correcting the ΔF508 conformational defect. *Trends Mol Med*. 2012;18(2):81-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.003> PMID:22138491 PMID:3643519
22. Thursfield RM, Davies JC. Cystic fibrosis: therapies targeting specific gene defects. *Paediatr Respir Rev*. 2012;13(4):215-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2012.04.003> PMID:23069118
23. Reddel HK, Lim TK, Mishima M, Wainwright CE, Knight DA. Year-in-review 2010: asthma, COPD, cystic fibrosis and airway biology. *Respirology*. 2011;16(3):540-52. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.01949.x> PMID:21338438
24. Jih KY, Li M, Hwang TC, Bompadre SG. The most common cystic fibrosis-associated mutation destabilizes the dimeric state of the nucleotide-binding domains of CFTR. *J Physiol*. 2011;589(Pt 11):2719-31. <http://dx.doi.org/10.1111/jphysiol.2010.202861> PMID:21486785 PMID:3112550
25. Thibodeau PH, Richardson JM 3rd, Wang W, Millen L, Watson J, Mendoza JL, et al. The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol*

Chem. 2010;285(46):35825-35. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.131623> PMID:20667826 PMCID:2975206

26. Ramsey BW, Banks-Schlegel S, Accurso FJ, Boucher RC, Cutting GR, Engelhardt JF, et al. Future directions in early

cystic fibrosis lung disease research: an NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(8):887-92. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201111-2068WS> PMID:22312017 PMCID:3360572

## ***Sobre os autores***

---

### ***Fernando Augusto de Lima Marson***

Pesquisador. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil.

### ***Carmen Sílvia Bertuzzo***

Professora. Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil.

### ***Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro***

Professora. Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil.

### ***Antônio Fernando Ribeiro***

Professor. Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil.

### ***José Dirceu Ribeiro***

Professor. Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) Brasil.