

Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center

Prevalência da mutação $\Delta F508$ no gene cystic fibrosis transmembrane conductance regulator em pacientes com fibrose cística em um centro de referência no Brasil

Andréia Marisa Bieger¹, Fernando Augusto de Lima Marson², Carmen Sílvia Bertuzzo³

Resumo

Objetivo: Verificar a presença da mutação $\Delta F508$ no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* na população de pacientes com fibrose cística, diagnosticados pelo teste de sódio e cloro no suor, em acompanhamento no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica da Universidade Estadual de Campinas, centro de referência no tratamento da fibrose cística.

Métodos: Foram analisadas 167 amostras de DNA de pacientes com fibrose cística. O genótipo dos pacientes foi determinado pela técnica de reação da polimerase e realizado cálculo para a frequência dos alelos e genótipos da mutação $\Delta F508$.

Resultados: A frequência genotípica encontrada foi, respectivamente, para os genótipos $-/-$, $\Delta F508/-$ e $\Delta F508/\Delta F508$: 43,7% (73 pacientes), 32,9% (55 pacientes) e 23,4% (39 pacientes). Do total de 334 alelos analisados, foi observada a frequência de 201 (60,18%) alelos para a ausência da mutação $\Delta F508$ e de 133 (39,82%) para a presença da mutação $\Delta F508$. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado, e obtivemos o valor de qui-quadrado = 16,34 ($p \leq 0,001$). A população analisada está fora do equilíbrio. Os valores esperados são, para os respectivos genótipos $-/-$, $\Delta F508/-$ e $\Delta F508/\Delta F508$: 32,22% (60,48 pacientes), 47,93% (80,04 pacientes) e 15,86% (26,48 pacientes).

Conclusões: Na população analisada, a mutação $\Delta F508$ se mostrou menos prevalente em relação ao alelo sem a mutação. A frequência encontrada neste estudo foi semelhante à de outras regiões do Brasil e do mundo, principalmente devido à origem predominantemente caucasóide da população incluída no estudo.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(6):531-4: Mucoviscidose, $\Delta F508$, genótipo.

Abstract

Objective: To verify the presence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among patients with cystic fibrosis diagnosed by the sweat test for sodium and chlorine and followed at the Pediatric Pneumology Outpatient Clinic of Universidade Estadual de Campinas, Brazil, a referral center for the treatment of cystic fibrosis.

Methods: The study analyzed 167 DNA samples from cystic fibrosis patients. Patients' genotype was determined by polymerase chain reaction, and allele and genotype frequencies of $\Delta F508$ mutation were calculated.

Results: The genotype frequencies found for $-/-$, $\Delta F508/-$, and $\Delta F508/\Delta F508$ genotypes were respectively: 43.7% (73 patients), 32.9% (55 patients), and 23.4% (39 patients). Of the 334 alleles analyzed, we observed a frequency of 201 (60.18%) alleles for the absence of $\Delta F508$ mutation and of 133 (39.82%) for the presence of $\Delta F508$ mutation. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated, obtaining a chi-square value = 16.34 ($p \leq 0.001$). The study population was out of equilibrium. The expected values for $-/-$, $\Delta F508/-$, and $\Delta F508/\Delta F508$ genotypes were respectively: 32.22% (60.48 patients), 47.93% (80.04 patients), and 15.86% (26.48 patients).

Conclusions: In the analyzed population, $\Delta F508$ mutation was less prevalent than the allele without this mutation. The frequency observed in this study was similar to that from other areas in Brazil and in the world, mainly due to the predominantly Caucasian origin of the population included in the study.

J Pediatr (Rio J). 2012;88(6):531-4: Mucoviscidosis, $\Delta F508$, genotype.

1. Biomédica. Especialista em Genética Molecular e Citogenética, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) Campinas, SP. Departamento de Genética Médica, UNICAMP, Campinas, SP.
2. Mestre, Saúde da Criança e do Adolescente. Doutorando, Saúde da Criança e do Adolescente, Departamento de Pediatria, FCM, UNICAMP, Campinas, SP.
3. Doutora. Professora, Departamento de Genética Médica, FCM, UNICAMP, Campinas, SP.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Apoio financeiro: Fundação de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX).

Como citar este artigo: Bieger AM, Marson FA, Bertuzzo CS. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(6):531-4.

Artigo submetido em 29.02.12, aceito em 06.06.12.

<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2225>

Introdução

A fibrose cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais frequente na população, principalmente de origem caucasóide. A incidência da FC varia conforme a etnia e, no Brasil, estima-se que a prevalência da doença seja de 1/3.500 até 1/10.000 nascidos vivos, dependendo da região geográfica¹.

Mutações no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), localizado na região 7q31, acarretam a perda da função da proteína CFTR, que em condições normais atua como canal de cloro²⁻⁴, ocasionando a FC.

Existem mais de 1.900 mutações identificadas no gene CFTR, mas a primeira a ser identificada e também a mais frequente é a $\Delta F508$, presente em cerca de 70% dos casos de FC, dependendo da população analisada⁵. Em algumas populações, é possível identificar facilmente todas as mutações do gene CFTR presentes nos pacientes; porém, em populações miscigenadas, como na brasileira, isso ainda não é viável. A mutação $\Delta F508$ ocorre devido à deleção de três bases no éxon 10, resultando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508, acarretando deficiência no dobramento da CFTR e, posteriormente, degradação no retículo endoplasmático rugoso⁶.

A proteína CFTR promove a reabsorção do cloro nas glândulas sudoríparas, porém na FC a proteína CFTR está ausente no epitélio ou apresenta alterações qualitativas e quantitativas em seu nível de expressão; assim, não ocorre a reabsorção de cloro, provocando altas concentrações de íons no suor. Essa disfunção pode afetar diversos órgãos, em particular os que secretam muco, incluindo as vias respiratórias superiores e inferiores, o pâncreas, o sistema biliar, a genitália masculina, o intestino e as glândulas sudoríparas⁷. O maior fator de morbidade e mortalidade na FC é o acúmulo de secreção que ocorre nos pulmões, acarretando a obstrução do mesmo. A apresentação clínica, a gravidade da doença e a velocidade de progressão da FC variam consideravelmente, e algumas variações podem ocorrer devido à presença de diferentes combinações de mutações no gene CFTR. Entre pacientes homocigotos para a mutação $\Delta F508$, a gravidade da doença pulmonar é variável, e os motivos da baixa correlação pulmonar genótipo-fenótipo não estão claros; no entanto, essa mutação em homocigose, ou juntamente com outra mutação grave, leva ao quadro clássico da FC⁸.

Decorrente da importância da mutação $\Delta F508$ na FC, por sua alta frequência e gravidade, o objetivo deste estudo foi verificar a presença da mutação $\Delta F508$ no gene CFTR na população de pacientes com FC, diagnosticados pelo teste de sódio e cloro no suor, em acompanhamento no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), centro de referência no tratamento da FC.

Métodos

Foram analisadas 167 amostras de DNA de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de FC provenientes do Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Hospital de

Clínicas da UNICAMP que apresentaram valor alterado (acima de 60 mEq/L) no teste de sódio e cloro no suor. O DNA foi extraído pela técnica de fenol-clorofórmio.

A amplificação de DNA para identificar a mutação $\Delta F508$ foi realizada nas 167 amostras de pacientes pela técnica de reação da polimerase (PCR), e os resultados da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 12%. A análise da estatística descritiva foi realizada pelo cálculo da frequência para o alelo e genótipo da mutação $\Delta F508$ no gene CFTR para a amostra analisada. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado pelo *software* Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator – Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (2008) para verificar se a distribuição dos genótipos da mutação $\Delta F508$ está em equilíbrio. O cálculo para verificar a associação da frequência do genótipo da mutação $\Delta F508$ no estudo de Bernardino et al.⁹ com a presente análise foi realizado pelo *software* Statistical Package for the Social Sciences v.17.0¹⁰.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da instituição segundo parecer #528/2008.

Resultados

Foram analisadas 167 amostras. Destas, as amostras que apresentaram a mutação $\Delta F508$ foram submetidas a uma nova amplificação para confirmar o resultado. Os resultados encontrados na análise da estatística descritiva para os genótipos com a mutação $\Delta F508$ estão representados na Tabela 1. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado, e obtivemos o valor de qui-quadrado = 16,34 ($p \leq 0,001$). A população analisada está fora do equilíbrio. Os valores esperados são para os respectivos genótipos: -/-, $\Delta F508$ /- e $\Delta F508/\Delta F508$ – 32,22% (60,48 pacientes), 47,93% (80,04 pacientes) e 15,86% (26,48 pacientes).

Discussão

Dentre os 167 pacientes analisados, 73 pacientes (43,7%) não apresentaram a mutação $\Delta F508$; 55 (32,9%) demonstraram a presença de heterocigose, possuindo um alelo mutado para $\Delta F508$, sendo, portanto heterocigotos compostos; e 39 (23,4%) apresentaram homocigose, com dois alelos mutados para $\Delta F508$. Todos os pacientes possuíam FC decorrente do diagnóstico prévio realizado pelo teste de sódio e cloro no suor.

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg realizado neste estudo mostrou que a distribuição genotípica dessa mutação em nossa amostra não está de acordo com a lei de Hardy-Weinberg. Isso pode estar ocorrendo devido ao fato de que muitos indivíduos homocigotos para essa mutação apresentam um quadro mais exuberante da doença, tendo, portanto, maior chance de ser diagnosticado, enquanto que os outros genótipos, por poderem ter associado mutações mais benignas, teriam um diagnóstico mais tardio. Além disso, é uma população que tem forte influência ambiental para a gravidade das manifestações clínicas, podendo interferir no equilíbrio Hardy-Weinberg.

Tabela 1 - Cálculo da frequência genotípica para a mutação $\Delta F508$

Genótipos	Frequência genotípica (n)	Porcentagem dos genótipos	Porcentagem cumulativa
-/-	73	43,7	43,7
$\Delta F508$ /-	55	32,9	76,6
$\Delta F508/\Delta F508$	39	23,4	100,0
Total	167	100,0	

(-) = ausência do alelo $\Delta F508$; n = tamanho amostral em número absoluto de pacientes.

A frequência dos alelos com a mutação $\Delta F508$ encontrada foi de 39,82% na população analisada. Okay et al.², em estudo realizado em São Paulo, encontrou uma frequência alélica para a mutação $\Delta F508$ de 44,5%, superior à encontrada no presente estudo. Outro estudo de frequência alélica revelou, em Minas Gerais e em São Paulo, valores menores do que no presente estudo, 21,7 e 33%, respectivamente^{11,12}. Em comparação ao trabalho de Bernardino et al.⁹, onde foi realizada a análise de 160 amostras de pacientes com FC para diversas mutações no gene CFTR, a frequência genotípica para a mutação $\Delta F508$ foi, respectivamente, de 47 (29,4%), 61 (38,1%) e 52 (32,5%) para os genótipos $\Delta F508/\Delta F508$, $\Delta F508$ /- e pacientes com duas mutações não identificadas. Quando comparamos nossos dados ao levantamento de Bernardino et al.⁹, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,109$). De qualquer maneira, os valores encontrados são próximos, e a pequena variação encontrada entre os trabalhos pode ser devido à variação étnica em cada microrregião.

Pelo fato de a FC ser uma doença genética autossômica recessiva, que possui altas taxas de morbidade e mortalidade, tornou-se de suma importância a adição do teste na triagem neonatal. Para um diagnóstico acurado, é fundamental a análise molecular. O teste molecular realizado neste estudo é um exame mundialmente difundido e, aliado à triagem neonatal, confere melhores condições de tratamento e possibilita o aconselhamento genético dos pais antes que ocorra nova gravidez⁶. Portanto, a análise molecular deve ser iniciada pela mutação $\Delta F508$, e quando o paciente for negativo para essa mutação, a análise molecular torna-se complexa devido ao grande número de mutações existentes no gene CFTR.

A caracterização molecular da doença proporciona aconselhamento genético e vigilância pulmonar apropriada, o que pode se tornar cada vez mais importante à medida que os avanços terapêuticos melhoram o prognóstico, permitindo o desenvolvimento de novas metodologias farmacológicas que possam atuar na correção do fenótipo da FC, enfatizando a importância da genotipagem de cada paciente durante o diagnóstico. A farmacoterapia da CFTR visa melhorar o transporte intracelular, a sua expressão e sua função, portanto esses

tratamentos são dirigidos a determinada classe de mutação específica ou a uma mutação apenas¹³.

Em conclusão, a população analisada mostrou que a mutação $\Delta F508$ foi menos prevalente em relação à somatória dos demais alelos mutantes. A frequência encontrada foi próxima de outras regiões do Brasil e do mundo, principalmente devido à origem predominantemente caucasóide da população incluída no estudo. No estudo, a frequência alélica para a mutação $\Delta F508$ foi de 39,82%, sendo 55 pacientes (32,9%) com a presença de heterozigose, possuindo um alelo mutado para $\Delta F508$, e 39 (23,4%) homozigotos, com dois alelos mutados para $\Delta F508$. Os dados corroboram a importância do uso da mutação $\Delta F508$ como diagnóstico dos pacientes e, principalmente, como fator a ser utilizado para o melhor aconselhamento genético. E, finalmente, com o desenvolvimento de novas terapias específicas para cada mutação, o *screening* para a $\Delta F508$ será importante, devido à sua alta frequência na população.

Para se determinar o genótipo do paciente para outras mutações no gene CFTR associadas à FC, a população analisada necessita de análise molecular para outras alterações no gene por técnicas moleculares distintas, como sequenciamento e outros métodos de análise gênica.

Agradecimentos

Os autores agradecem às funcionárias do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo apoio na realização deste trabalho e ao grupo interdisciplinar do Ambulatório de Pediatria da UNICAMP.

Referências

1. Okay TS, Oliveira WP, Raiz-Júnior R, Rodrigues JC, Del Negro GM. Frequency of the deltaF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in Sao Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60:131-4.
2. 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;245:1066-73.

3. 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;245:1059-65.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. [Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis](#). *Science*. 1989;245:1073-80.
5. Cystic Fibrosis Mutation Database (online). www.genet.sickkids.on.ca/cftr/. Acesso: 20/11/2011.
6. Ko YH, Thomas PJ, Delannoy MR, Pedersen PL. [The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein](#). *J Biol Chem*. 1993;268:24330-8.
7. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. [Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associa o com o genótipo e a gravidade da doença](#). *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:371-9.
8. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*. 2000;84:597-607.
9. Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, et al. [Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations](#). *Genet Test*. 2000;4:69-74.
10. SPSS 17.0 for Windows (computer program). Statistical Package for Social Science (SPSS). Release Version 17.0.1. Chicago, IL: SPSS Incorporation; 2011.
11. Martins CS, Ribeiro F, Costa FF. [Frequency of the cystic fibrosis delta F 508 mutation in a population from São Paulo State, Brazil](#). *Braz J Med Biol Res*. 1993;26:1037-40.
12. Vidigal PV, Reis FJ, Boson WL, De Marco LA, Brasileiro-Filho G. [p.F508del in a heterogeneous cystic fibrosis population from Minas Gerais, Brazil](#). *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:643-7.
13. Oliveira YA. *Fibrose quística [disserta o]*. Covilhã, Portugal: Universidade da Beira Interior; 2008.

Correspondência:

Fernando Augusto de Lima Marson
Departamento de Pediatria
Universidade Estadual de Campinas
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Cidade Universitária, Zeferino Vaz
CEP 13083-887 - Campinas, SP
Tel.: (19) 3521.8902
E-mail: fernandolimamarson@hotmail.com