WAGNER PAES DE OLIVEIRA

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DA DELEÇÃO DELTA F508 EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA ACOMPANHADOS
NA UNIDADE DE PNEUMOLOGIA DO INSTITUTO DA CRIANÇA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2003

WAGNER PAES DE OLIVEIRA

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE (PCR) PARA A DETECÇÃO DA DELEÇÃO DELTA F508 EM
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE FIBROSE CÍSTICA ACOMPANHADOS
NA UNIDADE DE PNEUMOLOGIA DO INSTITUTO DA CRIANÇA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Pediatria
Orientador: Dra Thelma Suely Okay

São Paulo
2003

À Heloisa Helenna, Paula e
Maria Auxiliadora "in memoriam",
meus três amores

AGRADECIMENTOS

A Dra. Thelma Suely Okay pela orientação, paciência e confiança únicos, exemplo de dedicação à causa do ICr.

À Sra. Gilda Maria Barbaro Del Negro e ao Sr. Roberto Raiz Jr. pela paciência em me ensinar as técnicas de PCR e pela dedicação com que realizam o trabalho do Laboratório de Pediatria Clínica - LIM/36 do Departamento de Pediatria da FMUSP.

À Sra. Maria Luisa Nunes pelo incentivo e a presteza em conseguir os materiais necessários a realização deste trabalho.

Aos funcionários da coleta do laboratório do ICr , em especial à Sra. Vilma Isoko Inamini, Sra. Sonia Rocha Lima, Sra. Dulcimar Aguiar Teixeira e Sra. Sonia Tomaz, pela destreza e paciência com os pacientes de fibrose cística.

Aos amigos Sra. Cecília Marlene de Andrade e o Sr. Flavio Gaddini Spina pelo carinho e incentivos constantes desde minha entrada no ICr.

Ao Sr. Nivaldo Lira Rocha e Sra. Milene Aparecida Ribeiro Rocha, pela rapidez na realização das cópias xerográficas necessárias a este trabalho.

Às secretárias Adriana Trindade Bezerra, Sra. Doris Lam, Sra Solange Riballo Bastieri Serodio e em especial à Sra. Denize Terezinha Costa pelo cuidado com os prazos e a atenção para conosco nos momentos de pressa.

Às bibliotecárias Sra Lourdes Torres, Srta. Steffanie Feitoza Brito e Sra. Mariza Kazue Umetsu pela revisão das referências bibliográficas.

Aos Dr Joaquim Carlos Rodrigues, Dra Cleyde Myriam Aversa Nakae, Dr. Luis Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho, Dra Tatiana Rozov e Dra Chong Ae Kim pela revisão e sugestões a este trabalho.

À minha esposa Paula pelo amor , paciência e incentivos constantes.

À todas as crianças com fibrose cística e seus familiares, objetivo primeiro e último deste trabalho.

E a Deus que me permitiu realizar este trabalho e conviver com tantas pessoas maravilhosas no ICr.

LISTA DE ABREVIATURAS

❖ .dATP	deoxinucleotídeo trifosfato contendo adenina
❖ .dCTP	deoxinucleotídeo trifosfato contendo citosina
❖ .dGTP	deoxinucleotídeo trifosfato contendo guanina
❖ .dTTP	deoxinucleotídeo trifosfato contendo timina
❖ .rpm	rotações por minuto
❖ CBAV	agenesia congênita bilateral do duto deferente
❖ CFTR	“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Receptor”
❖ DNA	ácido desoxiribonucléico
❖ EDTA	“ethylenediaminetetracetic acid disodium salt”
❖ FC	Fibrose Cística
❖ IRT	Tripsina Imuno Reativa
❖ OLA	“Oligonucleotide Ligation Assay”
❖ pb	pares de base
❖ PCR-ASO	Reação em Cadeia da Polimerase do tipo “Allele Specific Oligonucleotide”
❖ RX	radiografia de tórax
❖ SDS	“sodium dodecyl sulfate”
❖ Taq	enzima DNA polimerase extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
❖ Tm	“melting temperature”
❖ TRIS-HCL	“hydroxymethyl aminomethane” cujo pH é corrigido com ácido clorídrico
❖ ΔF508	deleção delta F508

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	Diagnóstico molecular da fibrose cística	05
2.	CASUÍSTICA	12
3.	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	PCR-ASO	18
3.2	Uso de substâncias co-solventes ou adjuvantes	24
3.3	PCR clássica para detecção da deleção $\Delta F508$	26
3.4	Protocolo da PCR-ASO utilizada no projeto	28
3.5	Comparação com os resultados dos laboratórios de referência	30
4.	RESULTADOS	32
5.	DISCUSSÃO	
	43	
6.	CONCLUSÕES	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8.	ANEXOS	63

RESUMO

As amostras sangüíneas de 108 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de Fibrose Cística foram analisadas com o objetivo de padronizar

uma PCR clássica e uma PCR- ASO para a detecção da mutação delta F508. Dos 108 pacientes analisados, 23 eram homozigotos para a deleção delta F508 (21,29%), 50 eram heterozigotos (46,29%), e 35 não portadores (32,40%). Ambas as PCR apresentaram reprodutibilidade de 100%, e houve concordância absoluta entre os resultados deste estudo e aqueles dos laboratórios de referência. Concluimos que as padronizações propostas foram bem sucedidas, e recomendamos que os pacientes sejam testados com as duas técnicas, o que, encarece a investigação laboratorial, porém, aumenta significativamente o grau de confiabilidade dos resultados.

SUMMARY

Blood samples were drawn from 110 clinically and laboratory diagnosed Cystic Fibrosis patients in order to standardize one classical amplification and one ASO-PCR for detecting the delta F508 mutation. Twenty-four of 110 patients (21,8%) were homozygous for the delta F508 deletion, 51 were heterozygous, and the remaining 35 (31,8%) were non-carriers. Both PCR techniques presented with 100% reproducibility, and there were no discrepancies between our results and those from the reference laboratories. We concluded that the 2 amplification systems were successfully standardized in this study, and recommended that all patients should be tested by both techniques in order to increase reliability, albeit the increment of laboratory costs.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é a doença genética de herança autossômica recessiva mais comum em populações caucasianas, com incidência de 1 para 3.200 nascidos vivos nos Estados Unidos. É menos freqüente entre negros (1

para 15.000) e asiáticos (1 para 31.000), chegando a 1 para 2.500 nascidos vivos em algumas populações européias (Hamosh et al., 1998).

Em todos os trabalhos realizados até o momento em pacientes com FC a deleção $\Delta F508$ foi encontrada. A deleção $\Delta F508$ apresenta uma frequência variável nos pacientes de diferentes regiões geográficas. Desde 50 a 88% em países do norte e oeste europeus (Tsui e Buchwald, 1992) até menos de 30% no meio leste europeu (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Na América latina foram encontradas frequências desde 29% no Chile a 62% na Argentina (Rios et al. 1994). Em São Paulo (Brasil) 33 %, 53% no Paraná e Rio Grande do Sul, e em outro trabalho 48% nos estados do sul, segundo os dados relatados por Martins et al. 1993, Maróstica et al. 1998 e Streit et al. 2003, respectivamente.

As manifestações pulmonares e pancreáticas da FC foram inicialmente descritas por Fanconi em 1936, e Andersen et al. em 1938. Em 1953, Di Saint'Agnese et al. descobriram que os pacientes portadores de FC apresentavam perdas excessivas de sais no suor, sendo então, desenvolvido o primeiro método para o diagnóstico da doença: a determinação da concentração de sódio e cloro no suor. O método aprovado para análise pela "United States Cystic Fibrosis Foundation" é o procedimento padronizado por Gibson-Cooke, também conhecido como iontoforese por pilocarpina que constitui o teste de referência para a confirmação ou exclusão do diagnóstico. O suor é colhido em papel de filtro estéril, com uma massa mínima de 50 mg de suor para ser analisada (Gibson & Cooke, 1959).

Como existem limitações técnicas para a realização da prova do suor em recém-nascidos e lactentes jovens, foi desenvolvido um teste para crianças desta faixa etária, a dosagem da Tripsina Imuno Reativa (IRT), exame que faz

parte dos testes de triagem neonatal de alguns centros que trabalham com populações de risco para a Fibrose Cística (indivíduos de origem européia, descendentes de judeus ashkenazic). Trata-se de teste que pode ser realizado logo após o nascimento (ao contrário da iontoforese), com sangue coletado em papel de filtro. Este teste, porém, apresenta porcentagem elevada de resultados falso-positivos e negativos, devendo sempre ser confirmado com a prova do cloro no suor quando o resultado for positivo, ou se for negativo, quando o quadro clínico for sugestivo de FC. Além disso, um a dois por cento dos pacientes portadores de Fibrose Cística podem apresentar concentrações de cloro no suor normais ou limítrofes (Stern et al. 1978; Highsmith et al. 1994; Strong et al., 1991; Augarten et al. 1993). Para estes pacientes, várias abordagens diagnósticas foram propostas: a investigação de azoospermia em indivíduos sexualmente maduros do sexo masculino (Stern et al., 1982); e a análise do DNA para a detecção de mutações tais como a 3849+10kb C ->T. Dentre os pacientes portadores desta mutação, mais de 50% possui o cloro no suor normal (Highsmith et al., 1994; Augarten et al., 1993). Também no caso das mutações G551S (Strong et al., 1991), e 2789+5 G ->A (Highsmith et al., 1994), já foram descritos pacientes com concentrações normais de cloro no suor.

Deve-se ainda lembrar, da existência de outras doenças que causam elevação das concentrações de cloro no suor e precisam ser excluídas: insuficiência adrenal, pseudo-hipoaldosteronismo, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, diabetes insipidus nefrogênico, displasia ectodérmica, glicogenoses do tipo I, mucopolissacaridoses, fucosidose, desnutrição, colestase familiar, pancreatite, hipogamaglobulinemia, e a síndrome de

Mauriac que cursa com diabetes de difícil controle, hepatomegalia com acúmulo de lípidos e glicogênio hepático, baixa estatura, retardo puberal, facies cushingóide. A administração de prostaglandina E1 também pode causar aumento do cloro no suor (Welsh et al.,1995).

Os sinais típicos que levam a suspeita de FC são: doença sino-pulmonar crônica caracterizada por tosse crônica e escarro persistente, anormalidades persistentes observadas no RX de tórax (como bronquiectasias, atelectasias e hiperinsuflação), obstrução das vias aéreas manifestadas por sibilos e “air trapping”, colonização/infecção persistente por microrganismos característicos da FC (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenza*), polipose nasal e baqueteamento digital; anormalidades gastrointestinais e nutricionais como o íleo meconial (logo ao nascimento), insuficiência pancreática, doença hepato-biliar crônica, desnutrição protéico-calórica, azoospermia e síndromes perdedoras de sal (Roseinstein et al., 1998).

O gene responsável pela Fibrose Cística é chamado de CFTR (“Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”), que codifica uma proteína de mesmo nome. Esta proteína foi caracterizada como sendo um canal de cloro presente nas células epiteliais do trato respiratório, pâncreas, glândulas sudoríparas e vasos deferentes (Rich et al, 1990; Zielenski et al., 1991). A perda ou disfunção da proteína CFTR leva a alterações da permeabilidade dos íons através da membrana celular, criando um desequilíbrio de íons e água entre as áreas intra e extracelulares, deixando as secreções desidratadas e espessas (Noone et al, 1994).

figura 1 estrutura bi-dimensional da proteína CFTR. Domínios do CFTR: TMD1 e TMD2; domínio regulador (R-domain), e os dois domínios de ligação dos nucleotídeos (NBD1 e NBD2). São ainda representados os locais onde ocorrem as mutações mais frequentes, inclusive a $\Delta F508$.

Recentemente, tem-se discutido que estas alterações podem reduzir a resistência local à bactérias devido a uma interferência na função dos peptídeos antimicrobianos que ocorreria pelo desequilíbrio nas trocas iônicas (Smith et al., 1996).

Os critérios diagnósticos para a FC compreendem uma ou mais características fenotípicas para FC (por exemplo : manifestações pulmonares

e/ou manifestações gastrointestinais típicas), ou história familiar de Fibrose Cística, ou teste neonatal de tripsina imunoreativa positivo **E** níveis de Cloro no suor superiores a 60 mmol/L pela iontoforese por pilocarpina em duas ou mais amostras, ou identificação de duas mutações para Fibrose Cística, ou demonstração de transporte de íons alterada no epitélio nasal (Roseinstein et al., 1998).

O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA

Em 1989, Riordan et al. clonaram e identificaram o gene da FC localizado no braço longo do cromossomo sete (7q), banda q 31-32, chamado de CFTR. Este gene possui 250.000 bases, 27 exons que transcritos codificam uma proteína de 1.480 aminoácidos conhecida pelo mesmo nome (CFTR).

As mutações do gene CFTR são classificadas em cinco tipos de acordo com a disfunção molecular observada ou prevista (Tsui 1992 ; Welsh e Smith 1993):

- a primeira classe inclui as mutações que geram um defeito de síntese da proteína codificada pelo gene CFTR, e seu representante mais freqüente é a mutação G542X.
- a segunda classe engloba os defeitos de processamento e maturação da proteína codificada pelo gene CFTR, e seu representante mais freqüente é a mutação $\Delta F508$.

- a terceira classe é composta pelas mutações que afetam a regulação e ativação do CFTR na superfície da célula epitelial, e seu representante mais freqüente é a mutação G551D.
- a quarta classe afeta a condução dos íons de cloro, ou o fechamento e abertura do canal de cloro, e os representantes mais freqüentes desta classe são as mutações R117H, R334 W e R347P.
- a quinta classe inclui mutações que causam alterações na maturação do RNA mensageiro do gene CFTR sem, no entanto, provocar alterações genômicas. Estas mutações causam redução acentuada ou completa ausência da proteína CFTR normal. O representante mais freqüente desta classe é a mutação 3849+10kb C→T.

A mutação mais comum entre os pacientes portadores de FC é uma deleção de três pares de bases (TTC) no exon 10 do gene da proteína CFTR, que acarreta a perda de uma fenilalanina na posição 508 da proteína. Esta deleção é conhecida como delta F508. Muito embora a deleção $\Delta F508$ tenha sido descrita em todas as populações estudadas até o momento em diferentes países e continentes, existem grandes diferenças na freqüência de cromossomos afetados com esta mutação de acordo com a população estudada ("The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium", 1990).

Foi observada freqüência mais elevada no norte da Europa em relação ao sul (Estivill et al., 1989; McIntosh et al. 1989; "European Working Group on CF Genetics", 1990), variando de 30 a 35% nos judeus ashkenazic (Lemna et

al., 1990; Lerer et al., 1990), a 87% na Dinamarca (Schwartz et al., 1990). A observação da existência deste gradiente dirigido do sul para o norte da Europa possibilitou que o grupo de estudos europeu aventasse a hipótese de que uma difusão desta mutação teria ocorrido no período neolítico, momento em que houve intensa migração de trabalhadores rurais da região leste em direção ao noroeste da Europa (Ammerman et al., 1984).

O fato de uma única mutação ser responsável por cerca de 70% de todas as mutações já encontradas nos indivíduos com Fibrose Cística, suscitou uma expectativa inicial de que existissem poucas mutações relacionadas à doença. Esta suposição revelou-se falsa, pois, atualmente, mais de 900 mutações do CFTR já foram relatadas ao “Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium”. Elas estão assim distribuídas: deleções (40%), mutações terminais ou “STOP” (18%), mutações da emenda (18%), mutação da matriz de leitura (22%), e outros tipos (2%) (Tsui et al. 1992 ; Welsh e Smith 1993).

Apesar da distribuição das mutações ao longo do gene CFTR ocorrer aparentemente ao acaso, existem regiões nas quais as mutações ocorrem com maior frequência, constituindo os chamados “hot spots”. As investigações sobre as origens da mutação $\Delta F508$ levaram à descoberta de alguns marcadores de haplotipos de DNA que se encontram muito próximos ao gene propriamente dito, demonstrando que o CFTR está associado a um grupo especial de haplótipos chamado de “Ia” (haplótipos são conjuntos de alelos localizados em regiões muito próximas, e em um mesmo cromossomo).

Estes resultados sugerem que todos os alelos portadores da deleção tiveram sua origem em um único evento mutacional (Kerem et al., 1990).

Estudos semelhantes foram realizados, porém com marcadores localizados em regiões mais distantes do CFTR (“European Working Group on CF Genetics”, 1990). Os resultados destes estudos demonstraram a existência de uma forte associação entre a deleção $\Delta F508$ e um determinado haplotipo “Ia ampliado”, que foi chamado de “B”. Além disso, a mutação também foi encontrada em cromossomos portadores de outros haplotipos, comprovando de maneira definitiva que eventos de recombinação genética ocorreram entre a região de DNA onde se localiza a deleção $\Delta F508$, e regiões de DNA que constituem marcadores mais distantes que o “Ia”, tais como o KM.19 e o XV-2c (Serre et al., 1990). No Brasil, Raskin et al. (1997) analisaram 193 famílias de pacientes com FC, brasileiros, brancos oriundos de cinco estados diferentes, encontrando 88% de ligação com o haplótipo B.

Muitas substituições de nucleotídeos no gene CFTR já foram descritas em várias partes do mundo, em indivíduos não doentes e heterozigotos para alguma mutação conhecida do CFTR. Um exemplo deste tipo de mutação “benigna” é a que ocorre exatamente na posição 508 da proteína CFTR, havendo substituição da fenilalanina por uma cisteína, por este motivo, denominada de F508C. Esta alteração já foi encontrada tanto em indivíduos presumidamente normais (Kobayashi et al., 1990), quanto em portadores de alelos contendo mutações associadas à Fibrose Cística (Zielenski et al., 1991; Meschede et al., 1993; Desgeorges et al., 1994).

Como já foi dito, mais de novecentas mutações já foram descritas no gene CFTR. Entretanto, é inadequado determinar o prognóstico de um indivíduo afetado única e exclusivamente com base em seu genótipo. A correlação genotipo-fenotipo parece não existir no que se refere às

manifestações pulmonares, sendo impossível no momento atual prever a gravidade do quadro clínico baseando-se apenas na análise da sequência de DNA do gene CFTR, ainda que a pesquisa englobe uma grande quantidade de mutações (Wilschanski et al., 1995; Koch et al., 2001).

Contrariamente, algumas poucas mutações que ocorrem entre os exons 1 e 8 do CFTR parecem estar associadas a quadros clínicos de fibrose cística mais brandos, pois estes indivíduos chegam à idade adulta relativamente bem (Zielenski et al., 1991; Dean et al., 1990). Cabe salientar que, em indivíduos portadores de agenesia congênita bilateral do ducto deferente (CBAV), existe uma incidência elevada da mutação R117H (Anguiano et al., 1992; Gervais et al., 1993).

A melhor correlação genotipo-fenotipo parece ocorrer nos pacientes portadores de duas mutações de classe I e/ou classe II. Estes indivíduos devem ser acompanhados porque é praticamente certo que evoluam com insuficiência pancreática. Ao contrário, as mutações de classe III e IV são normalmente encontradas em pacientes que possuem função pancreática preservada e quadro clínico atípico de FC (Kerem, 1996; Koch et al., 2001).

São exemplos desta situação os indivíduos do sexo masculino portadores da mutação R117H (classe IV), e que apresentam infertilidade devido à agenesia congênita bilateral do ducto deferente (CBAV). Na mutação G551S (classe III), os pacientes também apresentam função pancreática preservada (Strong et al., 1991), enquanto na mutação G551D, também de classe III, os pacientes costumam apresentar insuficiência pancreática (Cutting et al., 1990). Presume-se que estas diferenças sejam devidas ao grau de

regulação da função da proteína CFTR, porém, o exato mecanismo molecular ainda não foi esclarecido.

JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO

- a Fibrose Cística é a doença genética autossômica recessiva mais comum em populações caucasianas
- a mutação $\Delta F508$ é a mais freqüente nos indivíduos com FC de acordo com os dados da literatura médica
- 1 a 2% dos indivíduos portadores de Fibrose Cística apresentam a prova do cloro no suor dentro dos limites da normalidade

OBJETIVO GERAL

Avaliar a freqüência da deleção $\Delta F508$ em um grupo de pacientes portadores de Fibrose Cística em acompanhamento na Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) padronizar e validar uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) clássica para a detecção da deleção $\Delta F508$
- 2) padronizar e validar uma segunda PCR do tipo ASO (“Allele Specific Oligonucleotide”), que serviria igualmente à detecção da mutação delta F508, e ainda à confirmação dos resultados da primeira PCR.

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do Departamento de Pediatria (CPE), e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da FMUSP, em 15 de Setembro de 2000, tendo o protocolo recebido o número 641/00 (vide anexos).

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo todos os pacientes acompanhados no ambulatório da Pneumologia que preencheram os seguintes critérios diagnósticos, que incluem parâmetros clínicos e laboratoriais da Fibrose Cística, e o consentimento em participar do estudo:

- presença de doença pulmonar crônica clinicamente compatível com FC
- presença de cloro no suor aumentado (acima de 60 mEq/l), em pelo menos duas amostras.

CASUÍSTICA

GRUPO DE ESTUDO: compreendeu 110 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de fibrose cística, em seguimento no ambulatório da Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança, no período compreendido entre setembro de 2000 e setembro de 2002. Dentre os 110 pacientes havia dois pares de irmãos. Nestes casos houve sorteio daquele que seria excluído da análise estatística para que pudessemos realizar o estudo de 108 indivíduos não relacionados (não aparentados).

GRUPO CONTROLE: não foi necessário recorrer a um grupo controle propriamente dito, (indivíduos sem fibrose cística), com o objetivo de avaliar indivíduos sem a deleção $\Delta F508$, tendo em vista que existem alelos de todos os tipos (sem mutação e com mutação), dentre os pacientes do grupo de estudo. Para obter-se uma grande quantidade de DNA sem a mutação $\Delta F508$, o quê, nos permitiria fazer os inúmeros testes necessários à padronização das duas amplificações, três profissionais do Instituto da Criança que não

apresentam doença pulmonar (aguda ou crônica), foram voluntários e doaram sangue que serviu de controle para todo o estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

A seqüência de etapas cumpridas no desenvolvimento do projeto foi a seguinte:

- 1) coleta de 2 ml de sangue total em tubo contendo EDTA (tubo de hemograma), por punção venosa periférica, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- 2) extração de DNA de acordo com o protocolo descrito por Miller et al., 1988 (vide anexos).
- 3) determinação da concentração de DNA das amostras por meio de espectrofotometria com luz ultravioleta no comprimento de onda de 260 nm (Espectrofotômetro DU-70, Beckman, USA).
- 4) verificação da qualidade do DNA extraído, e da inexistência de inibidores da amplificação, por meio da PCR chamada “Universal” que amplifica um fragmento do gene da beta actina humana (vide anexos).
- 5) definição dos reagentes da reação de amplificação e determinação da concentração ótima dos mesmos (tampão de reação 10 vezes concentrado contendo Tris e KCl, seleção do pH mais apropriado para o tampão de reação, concentração de DNA humano a ser utilizada nas reações, concentração da mistura de dNTP, da enzima Taq polimerase, dos oligonucleotídeos iniciadores, do cloreto de magnésio).
- 6) determinação da necessidade de inclusão de substâncias co-solventes ou adjuvantes da reação de PCR, para melhorar tanto a sensibilidade quanto à

especificidade das reações. Escolha da(s) substância(s) e definição das concentrações.

- 7) determinação do método de detecção do material amplificado, tanto para a PCR clássica quanto para a PCR-ASO.
- 8) realização das PCR clássica e PCR-ASO das 110 amostras pertencentes ao estudo.
- 9) repetição de todas as PCR clássicas e das PCR-ASO.
- 10) comparação dos resultados das amplificações pelo método clássico e pela PCR-ASO.
- 11) comparação dos resultados este estudo com os obtidos nos dois laboratórios usados como referência, a saber: Instituto de Biociências da USP, Laboratório Genetika de Curitiba, e ainda com os resultados oriundos da técnica do multiplex-PCR-OLA seguido de seqüenciamento automático realizado com o kit comercial “Cystic Fibrosis Diagnostic System” da Applied Biosystems no LIM/36 da FMUSP (Laboratório de Pediatria Clínica/Experimental).

ETAPAS DESENVOLVIDAS NO PROJETO

coleta de sangue

DETECÇÃO DA DELEÇÃO $\Delta F508$ POR MEIO DE UMA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CLÁSSICA

Em uma PCR clássica amplifica-se a região contida entre os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), cada qual, escolhido em uma das

fitas de DNA (vide anexos). No caso da amplificação para a detecção da deleção $\Delta F508$, o desafio encontra-se no fato dos fragmentos amplificados possuírem pesos moleculares muito semelhantes, isto é, diferindo em apenas três pares de bases (98 bp para os fragmentos de DNA sem a mutação, e 95 bp para os que possuem a deleção). Esta discriminação foi possível graças ao uso de géis compostos por matrizes mais complexas e que oferecem maior resistência à migração dos fragmentos amplificados (Saiki et al. 1985 e 1988).

Indivíduo com a mutação $\Delta F508$ **AUSENTE**

DNA	...	GAA	AAT	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT	TCC	...
Proteína		Glu	Asn	Ile	Ile	Fen	Gli	Val	Ser	
Posição		504	505	506	507	508	509	510	511	

Indivíduo com a mutação $\Delta F508$ **PRESENTE**

DNA	...	GAA	AAT	ATC	AT-	-- T	GGT	GTT	TCC	...
Proteína		Glu	Asn	Ile	Ile	___	Gli	Val	Ser	

A PCR-ASO

ASO significa "Allele Specific Oligonucleotide". Trata-se de uma variação da técnica de PCR descrita por Ferrie et al., 1992 e Robertson et al., 1998. Em qualquer PCR, as três primeiras bases nitrogenadas localizadas na

extremidade 3' dos primers são as responsáveis pelo sucesso ou fracasso da amplificação. Em outros pontos do primer, pode haver hibridização incorreta com o DNA alvo, que ocorrendo ao longo da sequência do oligonucleotídeo, ou em uma posição mais próxima da extremidade 5' do primer, podem não inviabilizar a amplificação. São os chamados apareamentos incorretos ou “mismatchings”. Portanto, caso haja uma ligação perfeita das três primeiras bases da extremidade 3', isto é, de forma complementar ao DNA alvo do paciente (e isto ocorrer para os dois oligonucleotídeos iniciadores), haverá a síntese do fragmento de DNA em grandes quantidades. Exemplo: se as três bases na extremidade 3' do primer forem ATC, a amplificação só ocorrerá se houver as bases TAG no DNA alvo do paciente. Caso haja ausência de complementaridade (falta de apareamento do tipo canônico, ou seja, A com T, e C com G), em qualquer uma destas três primeiras bases da extremidade 3' dos dois primers, teoricamente, não haverá amplificação.

A técnica da PCR-ASO funciona em duas reações de PCR separadas, a saber: na primeira são usados primers que só se ligam à sequência de DNA não mutado. São empregados um primer “comum” e um primer “normal”, que amplificam um fragmento de 160 bp, para o caso desta pesquisa. Na outra PCR, um dos primers é “comum” (o mesmo da primeira reação), e o outro possui, em sua extremidade 3', uma sequência nucleotídica que só reconhece o DNA do paciente caso exista a deleção das três bases (isto é, eliminando-se o aminoácido fenilalanina na posição 508 da sequência protéica). Este oligonucleotídeo é chamado de “mutado” e a amplificação resulta em um fragmento de 157 bp. Desta forma, com duas PCRs diferentes é possível determinar se o paciente é homozigoto para a deleção $\Delta F508$ (apenas a

segunda PCR produzirá um fragmento amplificado), heterozigoto (haverá amplificação nas duas PCR), ou trata-se de um indivíduo com os dois alelos selvagens, isto é, sem esta mutação (fragmento amplificado apenas na primeira PCR).

PADRONIZAÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Sabe-se que as concentrações de reagentes da PCR constituem fator crucial para o sucesso das amplificações, tanto das clássicas, quanto das do tipo ASO (Ferrie et al., 1992). A tabela a seguir resume os reagentes da PCR, as concentrações testadas, e a que foi selecionada.

REAGENTE	CONCENTRAÇÕES TESTADAS	CONCENTRAÇÃO SELECIONADA
Tris-HCl (fazem parte do tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase)	100, 150 e 200 mM	100 mM

KCl (faz parte do tampão de reação da enzima Taq DNA Polimerase)	250, 500 e 750 mM	250 mM
pH do tampão de reação 10 vezes concentrado	pH de 7,5 a 9,5 variando de 0,5 em 0,5	PH 8,0
MgCl ₂ (o magnésio é cofator da enzima Taq DNA Polimerase)	1,0 a 5 mM variando de 0,5 em 0,5 mM	1,5 mM
Oligonucleotídeos iniciadores	0,1 a 1,0 µM variando de 0,1 em 0,1 µM	0,4 µM
Mistura de deoxinucleotídeos trifosfatos ou dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	100 a 800 µM de cada base, variando de 100 em 100 uM	200 µM
Enzima Taq DNA polimerase	1,0 a 5 unidades variando de 0,5 em 0,5 unidade para 50 µl de volume total de reação	2,5 unidades
DNA “molde” da amplificação	1 nanograma a 1 micrograma	50 ng (clássica) e 10 nanogramas na PCR-ASO

A concentração da enzima Taq DNA Polimerase utilizada é a preconizada por todos os fabricantes, ou seja, 2,5 unidades para cada 50 µl de volume total de reação. Trata-se de uma concentração que não é excessiva, e tampouco limitante. Em relação à mistura de deoxinucleotídeos trifosfatos, ou seja, de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, a concentração usada nas reações foi de

200 μM . Cada enzima Taq Polimerase é acompanhada de um tampão contendo concentrações variáveis de KCl e Tris-HCl em pH básico (variando de 7,5 a 9,2 na dependência da marca), pois a reação de PCR ocorre em meio alcalino. As concentrações destes sais alteram tanto a sensibilidade quanto a especificidade das reações. Com relação ao MgCl_2 , (o magnésio funciona como co-fator da enzima Taq DNA Polimerase), foi testado em concentrações de 1,0 a 5 mM, variando de 0,5 em 0,5 mM. A concentração normalmente utilizada nas amplificações é de 1,5 a 2,0 mM. Assim, pode ser usada a concentração de 1,0 mM quando se deseja aumento da especificidade (mesmo que a intensidade dos fragmentos amplificados seja menor), ou concentração acima de 2,0 mM, quando o desejado é aumentar a intensidade dos fragmentos amplificados (porém, com perda de especificidade, e possibilidade do aparecimento de bandas “espúrias”, isto é, inespecíficas). Os “primers” foram testados em concentrações variando de 0,1 a 1 μM (variando de 0,1 em 0,1 μM), e foi escolhida a concentração de 0,4 μM , lembrando que as concentrações insuficientes dos “primers” ou excessivas prejudicam a amplificação.

Com relação ao DNA molde ou “template”, as amostras foram testadas em concentrações variando de 1 ng a 1 μg . A concentração ótima foi aquela que permitiu a amplificação mais sensível e específica, no caso de 10 ng. As concentrações insuficientes de DNA ou o excesso de DNA podem acarretar resultados falso-negativos. O DNA em excesso pode ser denaturado de maneira deficiente, ficando os sítios de ligação dos oligonucleotídeos iniciadores inacessíveis, o que impede que a amplificação ocorra. E as concentrações de DNA insuficientes podem fazer com que o fragmento

amplificado não seja produzido em concentração adequada, isto é, não atinja os nanogramas necessários para que seja visível em gel de agarose ou de poliacrilamida.

A qualidade do DNA extraído também é crucial para o sucesso das amplificações, muito embora existam “kits” comerciais no mercado que trabalham com a amplificação de DNA bruto, sem precipitação, e sem retirada de proteínas. As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram testadas aplicando-se 500 nanogramas das referidas amostras em um gel de agarose a 0,8%. As amostras resultaram em bandas visíveis, e de alto peso molecular, comprovando que a etapa de extração foi realizada adequadamente. Caso o DNA estivesse fragmentado, ou seja, “degradado”, apareceriam várias bandas, ou até mesmo um “smear”. Trata-se de um “arraste” que traduz a presença de centenas de fragmentos de DNA de pesos moleculares diversos, significando que o material pode não se prestar à realização de testes genéticos.

Quanto ao número de ciclos de amplificação, empregou-se 40 ciclos com o objetivo de obter-se a melhor sensibilidade, com a manutenção da especificidade. Este número de ciclos é normalmente suficiente para produzir uma amplificação satisfatória com DNA humano, isto é, concentrações de DNA na ordem dos nanogramas, sendo suficiente para que possam ser visualizadas em gel, mesmo que o gene alvo da amplificação esteja representado uma única vez em cada célula.

Com relação à temperatura de denaturação, após a realização de inúmeros testes com temperaturas variando de 94 a 97°C, este laboratório passou a adotar 95°C para todas as amplificações que envolvem DNA humano. Os protocolos mais antigos de PCR utilizavam 94°C de temperatura

de denaturação, porém, com o passar do tempo, e o acúmulo de experiências bem e mal sucedidas, passou-se a utilizar 95°C para a denaturação deste tipo de DNA, pelo fato do mesmo apresentar elevada porcentagem de bases CG (55%).

A temperatura de extensão de 72°C foi escolhida de acordo com o preconizado pelo fabricante da enzima Taq DNA Polimerase (Amersham-Pharmacia Biotech), pois esta deve adequar-se à temperatura ótima de ação da enzima. Conseqüentemente, a única temperatura a ser calculada é a de “annealing” que depende basicamente da composição dos “primers”, isto é, da temperatura de “fusão” ou T_m , do inglês “melting temperature”. Esta é calculada de acordo com a porcentagem CG dos “primers”, isto é, quanto maior a porcentagem CG, maior a T_m . O comprimento dos oligonucleotídeos iniciadores também influencia a T_m (quanto mais longo o oligonucleotídeo, maior será a chance de conter bases C e G, e portanto maior será a T_m). O cálculo da T_m é realizado de acordo com a fórmula apresentada nos anexos.

A temperatura de “annealing” ideal é escolhida calculando-se a média dos T_m dos dois oligonucleotídeos iniciadores, e iniciando-se os testes 5 a 10°C abaixo deste valor. A seguir, aumenta-se a temperatura de grau em grau até a obtenção da melhor sensibilidade (bandas de maior intensidade), e especificidade (inexistência de bandas inespecíficas), podendo a temperatura de “annealing” atingir 5 a 10 graus acima da média calculada dos T_m dos 2 iniciadores, particularmente nos casos que requerem amplificações extremamente específicas ou “estringentes”.

USO DE SUBSTÂNCIAS CO-SOLVENTES OU ADJUVANTES

Sabendo-se que a concentração de todos os reagentes da tabela anterior foi selecionada, assim como o número e as temperaturas de ciclos e da concentração ideal de DNA a ser testada, dever-se-iam obter amplificações com excelente sensibilidade e especificidade. No entanto, isto nem sempre ocorre e, nestes casos, continua-se a padronização com a adição de substâncias co-solventes ou adjuvantes da PCR que melhoram a qualidade das amplificações. O quadro a seguir resume a ação de alguns dos representantes desta classe de substâncias (Rofls et al., 1999).

Substância	Modo de ação	Concentração
Nonidet P40	aumenta a denaturação de regiões ricas em CG	1 a 10%
Tween-20	aumenta a denaturação de regiões ricas em CG	0,1 a 2,5%
Glicerol	aumenta a denaturação de regiões ricas em CG	2,5 a 20%
BSA (soro albumina bovina)	estabilizador inespecífico da Taq Polimerase liga-se aos inibidores da PCR	10 a 100 µg/ml
DTT	capaz de reverter a inibição da Taq Polimerase	0,1 a 10 mM

Dithiothreitol	causada pelo SDS e pela proteinase K	
Formamida	facilita a ligação do oligonucleotídeo iniciador com o DNA alvo; diminui a temperatura de denaturação das regiões do DNA resistentes à fusão	1 a 10%
DMSO Dimethyl sulfóxido	melhora a denaturação das regiões do DNA que são ricas em CG e formam estruturas secundárias que impedem a ligação do oligonucleotídeo iniciador	1 a 10 %
Glicerol	Idem ao DMSO	2,5 a 20 %
(NH ₄) ₂ SO ₄ Sulfato de Amônia	melhora a denaturação das regiões do DNA que são ricas em CG; altera a T _m dos primers; afeta a ação da Taq polimerase	15 a 30 mM

PCR CLÁSSICA PARA A DETECÇÃO DA DELEÇÃO $\Delta F508$

Nesta PCR foram usados os primers C16B e C16D, que amplificam um fragmento de 98 pares de bases englobando a região afetada pela deleção $\Delta F508$ (Saiki et al. 1985 e 1988). Nesta PCR, um indivíduo normal (portador de dois alelos selvagens, ou seja, sem mutação), apresentará uma única banda de 98 bp, enquanto que um paciente homozigoto para esta deleção, isto é,

com os dois cromossomos “mutados”, apresentará uma banda única contendo três bases a menos (portanto, 95 bp em lugar de 98 bp). Um paciente heterozigoto para esta deleção terá os dois tipos de fragmento, um de 95 bp e o outro de 98 bp traduzindo a presença de um cromossomo normal e um afetado. A amplificação foi realizada seguindo o protocolo descrito por Saiki et al., 1985, e modificada em nosso laboratório a fim de obter-se a máxima sensibilidade e especificidade com os reagentes e equipamentos dos quais dispomos. Resumidamente, o protocolo ficou assim estabelecido : em 50 µl de volume total de reação foram adicionados entre 50 nanogramas de DNA genômico do paciente; 0,4 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, “sense” C16B (5'- GTTTCCTGGATTATGCCTGGGCA-3' e “anti-sense” C16D (5'-GTTGGCATGCTTTGATGACGTTTC). Foram realizados quarenta ciclos de amplificação em um termociclador (Minicycler PT-150, MJ Research), com as seguintes temperaturas e tempos: após uma etapa de denaturação inicial de 5 minutos a 95^oC, foram realizados os ciclos de amplificação propriamente ditos de 1 minuto a 95^oC, 1 minuto a 55^oC e 1 minuto a 72^oC, seguidos de uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72^oC.

Os produtos de amplificação foram analisados em um gel de poliacrilamida a 8% (em tampão TBE x1), pH 8,5 em condições não denaturantes. Os géis foram sempre preparados no dia anterior ao da corrida, em placas de vidro de dimensões 24X18 cm. Foram aplicados 10 microlitros de cada amostra amplificada misturados a 2 microlitros do corante azul de bromofenol/xilenocianol (Amersham Pharmacia-Biotech), em cada um dos orifícios do gel. As condições de eletroforese foram as seguintes: aplicação de 25 mA por placa, tensão de 450V, potência de 20W, tempo de corrida de 4

horas e 30 minutos, no sistema de eletroforese vertical refrigerado (Höefer SE 660, Amersham-Pharmacia Biotech).

O gel foi posteriormente corado com nitrato de prata para obter-se maior sensibilidade e definição das bandas. Para a revelação das bandas, a coloração dos géis foi baseada no método utilizado por Bassam et al. (1991). Todas as etapas de coloração foram realizadas sob agitação constante, em agitador orbital (LabLine Instruments, USA). Inicialmente, os géis foram colocados em solução fixadora de etanol a 10%, por no mínimo 30 minutos. Em seguida, adicionou-se ácido nítrico a 1% por 15 minutos, e realizou-se uma lavagem com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, USA), por 1 minuto; a seguir, adicionou-se 200 ml de solução de impregnação contendo nitrato de prata 0,1% e 300 µl de formaldeído a 37% por 30 minutos. Após nova lavagem com água ultra pura por 2 minutos, adicionou-se 200 ml da solução de revelação, contendo carbonato de sódio anidro a 3%, e 150 µl de formaldeído a 37%. Após o aparecimento das bandas, os géis foram colocados em solução de ácido acético a 10% para interromper a reação. Os géis foram então mantidos em água ultra-pura até o momento da secagem no Gel Dryer (BioRad, USA), à 80°C por 2 horas e 30 minutos.

PROTOCOLO DA PCR-ASO UTILIZADA NO PROJETO

Uma etapa crucial para que as PCR do tipo ASO funcionem bem é a escolha e a síntese dos oligonucleotídeos iniciadores (devem ser no mínimo desalinizados ou, de preferência purificados por cromatografia líquida). Após o

teste dos três primeiros iniciadores selecionados verificou-se o aparecimento de resultados falso-positivos e falso-negativos, devido à existência de outras variações na sequência de DNA ocorrendo no mesmo sítio da deleção $\Delta F508$, ou nas proximidades da região a ser estudada. Foi possível eliminar o problema por meio da modificação da segunda base nitrogenada das três que constituem a extremidade 3', tanto no oligonucleotídeo iniciador chamado de "normal", quanto no "mutado". Estes novos iniciadores permitiram diferenciar os três tipos de sequência ($\Delta F508$, F508C e $\Delta I507$). Este êxito só foi possível graças a um estudo minucioso da orientação de cada primer (com relação à direção de transcrição do gene CFTR). Um outro fator importante para o sucesso das amplificações, foi o comprimento dos primers, pois verificou-se que a região alvo da amplificação é muito rica em bases A e T, o que, geraria primers com T_m baixa. A única forma de contornar o problema foi alongar os primers, pois quanto mais longo for o iniciador maiores são as chances de conter bases C e G, e maior será a T_m . Esta, influencia diretamente a temperatura de "annealing", tornando-a mais elevada, permitindo que as reações de amplificação sejam mais específicas. Não foi por acaso que os primers selecionados nesta segunda etapa possuísem trinta bases, permitindo o emprego de temperaturas de "annealing", de 60°C.

O protocolo descrito por Ferrie et al., 1992, foi testado e adaptado as nossas condições de trabalho (tipo de termociclador, protocolo de extração de DNA, etc). Para tanto, foram usados os seguintes primers: comum ou DF-C (5'- GACTTCACTTCTAATGATGATTATGGGAGA-3') ; primer normal ou DF-j-N (5' -GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCACA- 3') e, finalmente, o primer mutado ou DF-w-M (5'-GTATCTATATTCATCATAGGAAACACCATT-3'). A T_m

calculada para os três iniciadores foi de 53,6°C para o DF-C, 52,5°C para o DF-j-N, e de 51,4°C para o DF-w- M. As condições de amplificação que resultaram na produção de bandas mais intensas e específicas foram: concentração de DNA entre 10 nanogramas, 200 µM de dNTP; 2,0 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada um dos primers, 30 µg/ml de BSA (Sigma), 15 mM de (NH₄)₂SO₄, 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase da marca Promega (USA) que foi utilizada com o tampão de reação do tipo B, contendo sais e co-solventes nas seguintes concentrações : 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 50% de glicerol, 0,5% de Tween 20 e 0,5% de Nonidet P-40. As amostras assim preparadas foram submetidas à amplificação em termociclador (Minicycler PTC-150, MJ Research). Após uma etapa de denaturação inicial de 5 minutos a 95°C, foram realizados quarenta ciclos de amplificação de 1 minuto a 95°C (denaturação), 1 minuto a 60°C (annealing) e 1 minuto a 72°C (extensão). A seguir, uma etapa final de extensão de 5 minutos a 72°C finaliza a amplificação. Dez microlitros do material amplificado foram analisados em eletroforese horizontal (HE-58, Horizon, USA), em géis de agarose a 2% (Tipo II, Sigma, USA). Após a eletroforese, os géis foram corados em tampão TAE1x contendo brometo de etídeo (0,5 ng/ml), e as bandas visualizadas em transiluminador com luz ultravioleta. Todos os resultados foram registrados em fotos polaróide em preto e branco (tipo 667).

AVALIAÇÃO INTRA-ENSAIO (REPETIÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES), INTER-ENSAIO (PCR-CONVENCIONAL X PCR-ASO) E COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS DOS LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA

No início do projeto, quarenta e cinco amostras já haviam sido testadas em Laboratórios de referência (Instituto de Biociências da USP e Laboratório Genetika de Curitiba). Além disso, setenta e quatro amostras das 110 coletadas foram amplificadas e seqüenciadas no âmbito da dissertação de mestrado do aluno Roberto Raiz Júnior, biologista supervisor do LIM/36 (Laboratório de Pediatria Clínica/ Experimental do Departamento de Pediatria da FMUSP), por meio de técnica Multiplex-PCR-OLA seguida de seqüenciamento automático ("Cystic Fibrosis Diagnostic System", Applied Biosystems, EUA). Os resultados dos dois laboratórios de referência e ainda os oriundos do estudo do LIM/36 foram usados como controle de qualidade deste estudo.

Após a determinação das concentrações ótimas de todos os reagentes da PCR e das temperaturas e número de ciclos a serem realizados, a reprodutibilidade das duas PCRs padronizadas neste projeto foi avaliada repetindo-se todas as reações, isto é, todas as PCRs clássicas e todas as PCRs-ASO (reprodutibilidade intra-ensaio) e, analisando a existência de resultados concordantes ou discordantes da primeira rotina em relação à segunda. Posteriormente, foram comparados os resultados dos dois tipos de amplificação (reprodutibilidade inter-ensaio). Uma última comparação foi realizada com os resultados oriundos dos Laboratórios de referência (Instituto de Biociências, Laboratório Genetika), e com o LIM/36 da FMUSP.

RESULTADOS

Foram estudados 110 pacientes, e após a exclusão de dois deles, os resultados de 108 indivíduos foram analisados, sendo 52 do sexo masculino e 56 do sexo feminino. Nas 108 amostras de DNA testadas, a PCR com primers universais foi positiva, comprovando a qualidade das extrações de DNA e a inexistência de inibidores da amplificação.

Os testes intra-ensaio revelaram reprodutibilidade de 100%, pois não houve discrepância entre os resultados obtidos na primeira e na segunda

amplificação, e isto ocorreu para ambos os métodos (PCR clássica e PCR-ASO).

Os testes inter-ensaio, que consistiram na comparação dos resultados obtidos na PCR clássica e na PCR-ASO para uma mesma amostra de DNA, também revelaram concordância de 100%.

Quando os dados foram analisados sem a discriminação dos pacientes de acordo com o sexo, nos 108 pacientes verificamos que em 35 indivíduos a deleção $\Delta F508$ não foi detectada (35/108 ou 32,40%), 50 pacientes foram heterozigotos para a deleção $\Delta F508$ (50/108 ou 46,30%), isto é, apresentaram um cromossomo sem a mutação e um com a mutação, e finalmente, 23 foram homozigotos para a deleção $\Delta F508$ (23/108 ou 21,30%), isto é, apresentaram os dois cromossomos com a mutação.

Dos 52 pacientes do sexo masculino estudados, em 18 a deleção $\Delta F508$ não foi detectada (18/52 ou 34,62%), 25 foram heterozigotos (25/52 ou 48,08%), e 09 foram homozigotos (09/52 ou 17,30%). Dos 56 pacientes do sexo feminino, em 17 a deleção $\Delta F508$ não foi detectada (17/56 ou 30,36%), 25 foram heterozigotos (25/56 ou 44,64%), e 14 foram homozigotos (14/56 ou 25,0%).

Tabela 1. Distribuição dos 108 pacientes do estudo de acordo com o genotipo obtido por PCR

SEXO		CATEGORIAS		TOTAL
	Deleção $\Delta F508$ ausente nos 2 cromossomos	Homozigoto para a deleção $\Delta F508$	Heterozigoto para a deleção $\Delta F508$	
Masculino	18	09	25	52
Feminino	17	14	25	56
Total	35	23	50	108

Tabela 2. Pacientes com Fibrose Cística incluídos no estudo e descritos de acordo com a ordem de coleta de sangue, o sexo, o uso de medicamentos, os resultados das PCR clássica e PCR-ASO para a detecção da deleção $\Delta F508$, e ainda de acordo com os resultados dos dois laboratórios de referência que empregaram metodologias moleculares diferentes para a detecção da deleção $\Delta F508$, além dos resultados do LIM/36 (vide descrição especificada a seguir):

1 - Laboratório de - Instituto de Biociências da USP: PCR + restrição enzimática + detecção em gel de agarose. Foram testadas 24 amostras do por este método

2- Laboratório de referência -Genetika de Curitiba: PCR + eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram testadas 21 amostras por este método.

3- LIM/36 da FMUSP: multiplex - PCR + OLA + seqüenciamento automático. Foram testadas setenta e quatro amostras por este método.

NT = não testado por laboratório de referência ou por seqüenciamento no LIM/36

Observação : os pacientes 45 e 93 foram excluídos da análise estatística e os pacientes 69 e 103 não compareceram para a coleta.

Paciente	Sexo	DNase e/ou Enzima pancreática	PCR Clássica e PCR –ASO para a detecção da deleção $\Delta F508$	Laboratórios de Referência
01	M	DNase + enzima	Ausente	2 + 3
02	M	Enzima	Heterozigoto	3
03	F	DNase + enzima	Ausente	3

04	F	DNase + enzima	Ausente	3
05	F	DNase + enzima	Heterozigoto	3
06	M	Enzima	Heterozigoto	1
07	F	DNase + enzima	Homozigoto	3
08	F	DNase + enzima	Homozigoto	3
09	M	Não recebe	Ausente	1 + 3
10	M	Enzima	Ausente	1 + 3
11	M	DNase + enzima	Heterozigoto	3
12	F	Enzima	Homozigoto	3
13	F	DNase + enzima	Homozigoto	3
14	M	DNase + enzima	Heterozigoto	1 + 3
15	F	DNase + enzima	Heterozigoto	2 + 3
16	F	DNase + enzima	Ausente	NT
17	M	DNase + enzima	Ausente	1 + 3
18	M	Enzima	Heterozigoto	3
19	M	Enzima	Homozigoto	3
20	M	Enzima	Homozigoto	3
21	M	DNase + enzima	Heterozigoto	2 + 3
22	F	DNase + enzima	Ausente	1 + 3
23	M	Não recebe	Heterozigoto	3
24	F	DNase + enzima	Heterozigoto	1 + 3
25	M	DNase + enzima	Ausente	1 + 3
26	M	DNase + enzima	Heterozigoto	1 + 3
27	M	DNase + enzima	Heterozigoto	3

28	M	DNase + enzima	Heterozigoto	3
29	F	DNase + enzima	Homozigoto	3
30	M	Enzima	Homozigoto	3
31	M	Enzima	Heterozigoto	3
32	F	Enzima	Homozigoto	3
33	F	Enzima	Heterozigoto	3
34	F	DNase + enzima	Heterozigoto	2 + 3
35	M	DNase + enzima	Ausente	3
36	F	DNase + enzima	Heterozigoto	NT
37	F	DNase + enzima	Ausente	1+ 3
38	M	Enzima	Heterozigoto	3
39	F	DNase + enzima	Homozigoto	2 + 3
40	M	Não recebe	Ausente	NT
41	F	DNase + enzima	Heterozigoto	1
42	M	DNase + enzima	Heterozigoto	NT
43	M	DNase + enzima	Heterozigoto	2 + 3
44	M	DNase + enzima	Homozigoto	2 + 3
45	M	DNase + enzima	Homozigoto	2 + 3 excluído
46	F	DNase + enzima	Ausente	2 + 3
47	F	DNase + enzima	Homozigoto	NT
48	M	Não recebe	Homozigoto	NT
49	M	DNase + enzima	Heterozigoto	2
50	F	Enzima	Ausente	2 + 3
51	M	DNase + enzima	Homozigoto	3

52	F	Não recebe	Ausente	3
53	F	Enzima	Ausente	1
54	M	DNase + enzima	Heterozigoto	3
55	F	DNase + enzima	Homozigoto	2 + 3
56	F	Enzima	Heterozigoto	1 + 3
57	F	DNase + enzima	Heterozigoto	2
58	F	DNase + enzima	Heterozigoto	3
59	M	DNase + enzima	Ausente	3
60	F	DNase + enzima	Heterozigoto	3
61	M	DNase	Heterozigoto	NT
62	M	DNase + enzima	Heterozigoto	1 +3
63	M	DNase + enzima	Heterozigoto	1+ 3
64	M	Enzima	Heterozigoto	1 + 3
65	F	Enzima	Homozigoto	2 + 3
66	M	Enzima	Heterozigoto	2
67	M	Enzima	Heterozigoto	3
68	F	Enzima	Homozigoto	NT
69	-----	-----	-----	não compareceu
70	F	DNase + enzima	Ausente	1
71	M	DNase + enzima	Ausente	NT
72	F	DNase + enzima	Ausente	2
73	F	DNase + enzima	Heterozigoto	2
74	F	DNase + enzima	Homozigoto	3
75	F	DNase + enzima	Heterozigoto	NT

76	M	DNase + enzima	Heterozigoto	NT
77	M	DNase + enzima	Homozigoto	1+ 3
78	M	DNase + enzima	Ausente	NT
79	M	DNase + enzima	Homozigoto	NT
80	F	DNase + enzima	Homozigoto	2 + 3
81	F	DNase + enzima	Heterozigoto	2
82	F	Enzima	Ausente	1
83	F	Enzima	Ausente	1
84	M	DNase + enzima	Ausente	3
85	M	Enzima	Ausente	3
86	M	Não recebe	Ausente	2
87	F	DNase + enzima	Heterozigoto	3
88	F	DNase + enzima	Heterozigoto	1
89	F	DNase + enzima	Ausente	3
90	M	Enzima	Ausente	1 + 3
91	M	Enzima	Heterozigoto	3
92	F	Não recebe	Heterozigoto	NT
93	F	Não recebe	Heterozigoto	3 excluído
94	M	Não recebe	Heterozigoto	NT
95	M	Não recebe	Homozigoto	NT
96	F	Não recebe	Heterozigoto	2 + 3
97	F	Enzima	Heterozigoto	NT
98	F	DNase	Ausente	NT
99	M	Enzima	Ausente	NT

100	M	Não recebe	Ausente	NT
101	F	Enzima	Homozigoto	NT
102	F	Não recebe	Heterozigoto	NT
103	-----	-----	-----	não compareceu
104	M	DNAse + enzima	Ausente	1+ 3
105	F	DNAse + enzima	Ausente	3
106	F	Enzima	Heterozigoto	3
107	F	DNAse + enzima	Heterozigoto	3
108	F	Enzima	Heterozigoto	3
109	F	Não recebe	Heterozigoto	3
110	M	DNAse + enzima	Heterozigoto	1 + 3
111	F	Não recebe	Homozigoto	3
112	F	Enzima	Ausente	3

Figura 1. Eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação da PCR universal que amplifica um fragmento do gene da beta-actina humana. Esta amplificação deve necessariamente ser positiva para comprovar a qualidade do DNA extraído, assegurando ainda, a inexistência de

Pista 1: marcador de peso molecular 100bp ladder (“Invitrogen, USA”)

Pista 2: controle negativo (água estéril em vez de DNA)

Pistas 3,4,5 e 6: quatro amostras pertencentes ao estudo (todas positivas)

Pista 7: espaço vazio (não foi aplicada nenhuma amostra)

Pista 8: controle positivo (amostra de DNA que já havia sido testada com estes iniciadores e produzira amplificação)

Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando os produtos de amplificação obtidos com os primers 16B e 16D (pacientes sem a mutação $\Delta F508$ possuem duas bandas de 98 bp, heterozigotos uma banda de 98 bp e 1 de 95 bp, enquanto que os homozigotos possuem duas bandas com três pares de base a menos, isto é, duas bandas de 95 bp). O marcador de peso molecular usado foi o 25 bp ladder (“Invitrogen, USA”). Foram usadas as siglas **np** para caracterizar os não portadores da mutação, **he** para os heterozigotos e **ho** para os homozigotos.

Figura 3. Eletroforese dos produtos de amplificação da PCR-ASO em gel de agarose a 3,0%. Em **A** está representada a amplificação com os primers comum + normal, e em **B** a amplificação com os primers comum + mutado

Pista 1: marcador de peso molecular 50 bp ladder (“Invitrogen – USA”)

Pista 2: controle negativo de reagentes (A) e controle negativo da extração (B)

Pista 3: paciente não portador da deleção $\Delta F508$

Pista 4: outro paciente não portador da deleção $\Delta F508$

Pista 5: paciente heterozigoto para a deleção $\Delta F508$ (1 cromossomo sem mutação e o outro afetado)

Pista 6: paciente homozigoto para a deleção $\Delta F508$ (2 cromossomos afetados)

Pista 7: outro paciente homozigoto para a deleção $\Delta F508$ (2 cromossomos afetados)

Pista 8: controle positivo (indivíduo não portador da deleção $\Delta F508$)

DISCUSSÃO

Tendo em vista que a deleção $\Delta F508$ foi a única das mutações associadas à fibrose cística encontrada em todos os estudos já realizados sobre o tema, além de ser a mais freqüente, resolvemos verificar qual foi o desempenho das duas PCR padronizadas neste projeto para a confirmação do diagnóstico de fibrose cística associada à mutação $\Delta F508$ no grupo de pacientes estudado. Esperávamos encontrar uma freqüência mais baixa desta mutação na casuística deste estudo em relação aos relatos europeus e norte americanos devido à maior miscigenação racial existente na população brasileira, muito embora soubéssemos que os pacientes encaminhados à Unidade de Pneumologia do Instituto da Criança sejam, em geral, aqueles que apresentam quadro clínico mais grave, o que de certa forma favoreceria o encontro de pacientes com a mutação $\Delta F508$.

O presente projeto de pesquisa estudou 108 pacientes, todos residentes no Estado de São Paulo, dos quais 23 foram homozigotos para a deleção $\Delta F508$, 50 foram heterozigotos, e 35 foram considerados não portadores. Se

os resultados forem analisados em termos de cromossomos ou alelos, como ocorre nos estudos genéticos, os 108 pacientes possuem 216 cromossomos ou alelos, dos quais 96 (96/216 ou 44,44%), são portadores da mutação, e 120 (120/216 ou 55,55%), não apresentaram a mutação. Em 1993, Raskin et al. estudaram 190 pacientes caucasóides do Sul e Sudeste do Brasil, sendo 60 do Rio Grande do Sul, 24 de Santa Catarina, 17 do Paraná, 58 de São Paulo e 31 de Minas Gerais. A frequência global de cromossomos portadores da deleção $\Delta F508$ foi de 47%, sendo 49% no Rio Grande do Sul, 27% em Santa Catarina, 44% no Paraná, 52% em São Paulo, e 53% em Minas Gerais. Em relação a este estudo, a frequência que encontramos de 44,44% foi inferior aos 52% e ambas foram inferiores aos 70% encontrados em países europeus e em algumas regiões dos EUA (Koch et al 2001).

Em outro estudo mais recente realizado no Rio Grande do Sul por Streit et al. (2003), foram analisados 77 pacientes não relacionados sendo encontrados 48,7% de alelos com a deleção $\Delta F508$. Esta frequência de 48,7% está muito próxima da frequência de 44,45% encontrada neste estudo.

Apesar da importância da mutação $\Delta F508$ para a população estudada, reconhecemos que a investigação de uma única mutação não é suficiente para que um diagnóstico próximo de 90% fosse atingido, o que poderia ser considerado satisfatório. Para tanto, seria necessário analisar entre 12 e 30 mutações, dependendo das características da população. Mesmo assim, a investigação de uma única mutação foi capaz de detectar 44,44% de cromossomos afetados em nossa casuística, muito provavelmente pelo fato do Instituto da Criança constituir um centro de referência para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com FC, fazendo com que pacientes com

quadro clínico mais grave sejam encaminhados para a Unidade de Pneumologia da instituição, como já foi mencionado anteriormente. Um outro dado reforça esta idéia de que os nossos pacientes apresentam quadro clínico mais grave, a porcentagem deles que recebe medicação, quer seja a DNase, ou a reposição de enzimas pancreáticas. Do total de 108 pacientes, 94 recebem uma ou ambas as medicações (87,04%), e apenas 14 não recebem medicação (12,96%). Obviamente, para que pudéssemos apresentar uma avaliação precisa do grau de gravidade da doença pulmonar dos pacientes incluídos nesta casuística, seria necessário comparar nossos resultados com as avaliações de função pulmonar e os escore clínicos, o que pretendemos realizar após o término do estudo.

Neste projeto, optamos pela extração de DNA a partir de sangue total colhido em tubo com EDTA por já utilizarmos o procedimento há alguns anos, com sucesso. Na escolha do protocolo a ser empregado, alguns fatores foram considerados, pois o método deveria contemplar alguns quesitos:

- a) permitir o armazenamento a longo prazo do DNA, com a preservação de sua qualidade, e um mínimo de degradação
- b) permitir a obtenção de quantidade suficiente para uso na investigação de outras mutações associadas à fibrose cística, que o LIM/36 pretende padronizar em futuro próximo

- c) evitar o risco profissional do contato diário com substâncias nocivas à saúde, tais como os solventes orgânicos, utilizados nos protocolos de extração de DNA antigos, que continham etapas com fenol e clorofórmio
- d) evitar o acúmulo, no laboratório, de material de descarte nocivo à saúde, como por exemplo o fenol

Devido a estes fatores, optamos pela utilização de um protocolo de extração de DNA clássico com sais (“salting out”), descrito por Miller et al. em 1988. Trata-se de um protocolo longo, porém, permite a recuperação de grandes quantidades de DNA de excelente qualidade, precipitado com álcoois.

Todos os sais e reagentes utilizados para a realização das amplificações são próprios para uso em Biologia Molecular, isto é, apresentam um grau de pureza elevado. O material descartável usado nas diferentes etapas de extração (ponteiras e microtubos) também apresentam qualidade para uso em Biologia Molecular, além de serem livres de DNAses e RNAses.

Para a padronização da PCR clássica, não foi necessário usar nenhuma substância co-solvente ou adjuvante. A determinação da concentração ótima dos reagentes, do DNA “molde” da amplificação, e a escolha das temperaturas e tempos dos ciclos de amplificação, foram suficientes para que o método fosse padronizado com sucesso. É importante salientar que, após a amplificação na PCR-Universal, o DNA de cada amostra foi testado em várias concentrações para determinarmos a faixa na qual a amplificação era mais satisfatória, isto é, apresentava a melhor sensibilidade e especificidade. A seguir, os amplificados foram aplicados a um gel de agarose a 2%,

procedimento este que precedeu a análise no gel de poliacrilamida, com o intuito de determinar-se a intensidade das amplificações. Desta forma, foi possível verificar se a amostra deveria ser aplicada pura ou diluída (e qual a melhor diluição), para que as bandas visualizadas no gel de poliacrilamida apresentassem o melhor grau de resolução. Estas etapas suplementares foram responsáveis pela obtenção de géis de poliacrilamida contendo amostras de intensidades comparáveis, evitando o aparecimento de “borrões” no caso de amostras com amplificadas muito intensos, ou de bandas imperceptíveis no caso de amostras com pouca amplificação, facilitando a interpretação dos resultados. A etapa seguinte de coloração dos géis de poliacrilamida pela prata, tornou-se mais fácil com estas medidas, porém, requer uma cuba de eletroforese vertical e refrigerada, em gel longo o suficiente para permitir a separação de bandas que diferem em apenas três pares de bases (98 bp e 95 bp).

Ainda com relação à PCR clássica com detecção em gel de poliacrilamida, é importante ressaltar a observação de dois fragmentos de DNA amplificados cujos pesos moleculares situam-se entre 100 e 125 bp, e que estão presentes em todas as amostras de pacientes heterozigotos. Ainda que estas duas bandas funcionem como “marcadores” de pacientes heterozigotos, e já tenham sido identificadas em outros estudos (Chong et al., 1990), não se sabe até o momento o quê representam. Seria necessário que elas fossem seqüenciadas para que pudéssemos compreender se possuem alguma importância biológica, ou se representam apenas um artefato técnico.

Com relação à PCR-ASO, no caso específico da deleção $\Delta F508$, o oligonucleotídeo inicialmente escolhido como o “normal” produzia reações

inespecíficas em algumas situações nas quais o paciente era portador da mutação benigna chamada de $\Delta I507$, fazendo com que os portadores desta mutação fossem confundidos com os portadores da deleção $\Delta F508$, ou ainda, com portadores de outra mutação considerada “benigna”, a $F508C$ (Schwartz et al., 1991). O estudo minucioso da orientação de cada primer, e a modificação de algumas bases foi, ao menos neste estudo, suficiente para que a discriminação fosse confiável.

Em alguns casos tais como no diagnóstico prenatal, recomenda-se que o DNA do feto ou da criança seja analisado juntamente com o sangue materno. Existem descrições de falsos-positivos e negativos que ocorreram com material proveniente de biópsia de vilo corial devido à mistura de material fetal com sangue materno. Existem ainda casos nos quais também recomenda-se a análise do sangue paterno, além do materno, em paralelo com o material da criança: no diagnóstico de pacientes heterozigotos $\Delta F508/F508C$, nas dissomias uniparentais, e finalmente nos pacientes $\Delta F508$ portadores de deleção heterozigota composta. Nestas três situações nem mesmo os géis de poliacrilamida são capazes de diagnosticar corretamente quando analisa-se apenas o DNA da criança (Welsh et al. 1995).

A padronização final da técnica ASO não foi possível apenas com o uso dos reagentes normalmente utilizados para a padronização de amplificações e ainda do ajuste dos ciclos, tempos e temperaturas. Foi necessário testar e incluir diferentes substâncias co-solventes e adjuvantes da PCR, além de trocar a enzima Taq DNA Polimerase por outra marca que é vendida juntamente com o seu tampão de reação 10 vezes concentrado específico (concentração de sais e pH conhecidos). Estes ajustes técnicos, apesar de

terem prolongado o período de padronização, permitiram que a reação fosse realizada com economia, pois não foi necessário lançar mão de enzimas DNA polimerases especiais, o que teria elevado sobremaneira o custo da amplificação. Este fator “custo” é crucial em uma instituição pública na qual pretende-se disponibilizar o teste para uma quantidade significativa de pacientes.

O controle de qualidade dos resultados foi feito por meio dos ensaios de reprodutibilidade (intra-ensaio e inter-ensaio). Para os testes intra-ensaio houve repetição de todas as amplificações clássicas e comparação com os resultados anteriormente obtidos, bem como repetição de todas as PCR-ASO e comparação com os resultados obtidos na primeira amplificação, com a mesma técnica. A seguir, realizamos os testes de reprodutibilidade inter-ensaio, isto é, comparação dos resultados da PCR clássica com aqueles da PCR-ASO, tanto do primeiro teste, quanto das repetições. Para finalizar, houve a comparação dos resultados das nossas duas técnicas com um dos laboratórios de referência, ou ainda com o LIM/36 que usou o método da multiplex-PCR seguido de hibridização com sondas fluorescentes (OLA) e posterior seqüenciamento automático. Das 110 amostras, 31 foram testadas por dois métodos além daqueles deste estudo (28,18%), 57 foram testadas por um método além dos dois métodos do estudo (51,81%), e infelizmente 22 amostras não puderam ser testadas por outros métodos (20%), significando que o controle de qualidade abrangeu 80% das amostras, porcentagem que foi considerada satisfatória. Os laboratórios de referência 1 e 2 já haviam realizado os 45 testes antes do início do presente estudo. Apenas o LIM/36

realizou os seqüenciamentos após o término dos testes do estudo, sendo que a escolha das amostras foi feita por sorteio.

Apesar de termos elevado o custo do projeto de pesquisa por optarmos pela realização de dois tipos de PCR (clássica e ASO), a comparação das duas amplificações garante a qualidade dos resultados. Entretanto, para a maior parte das amostras não é necessário realizarmos as duas técnicas. A PCR clássica é de simples execução, não requer o uso de substâncias co-solventes ou adjuvantes da PCR, porém, apresenta uma fase de detecção do material amplificado mais complexa e demorada, isto é, a eletroforese vertical em cuba refrigerada usando géis de poliacrilamida corados pela prata. O processo total, neste caso, consome de dois a três dias (cinco dias se houver necessidade de repetição). Com relação à PCR-ASO, são necessárias duas amplificações para a liberação de um resultado, ou seja, oligonucleotídeo iniciador comum + normal, e iniciador comum + mutado. São, portanto, duas PCRs, que podem ser concluídas em um dia de trabalho, juntamente com a PCR-Universal. No caso da PCR-ASO, a dificuldade maior foi a etapa de padronização, e nas análises futuras, será a manutenção rigorosa das condições de amplificação, sob pena de obter-se resultados de difícil interpretação. Estas reações são tão sensíveis que o simples fato de mudarmos o termociclador pode modificar drasticamente os resultados. Isto ocorre pelo fato de cada equipamento possuir uma velocidade de subida e de descida da temperatura que é característica da marca e do modelo de aparelho. É por este motivo que as PCR-ASO foram realizadas em condições bastante “estringentes”, isto é, de alta especificidade, com o emprego de várias substâncias co-solventes e adjuvantes da amplificação, além de uma

temperatura de “annealing” de 60°C, ou seja 7 a 8 °C acima da T_m calculada para os oligonucleotídeos iniciadores. Estes fatores conferem confiabilidade às amplificações, porém, as reações devem ser realizadas por profissionais extremamente qualificados, com reagentes de qualidade, e equipamentos adequados (aferidos e submetidos à manutenções periódicas).

Levando em consideração todos estes fatores, inclusive o custo dos reagentes e o tempo consumido em cada reação (PCR clássica em comparação à PCR-ASO) e, ainda a possibilidade da existência de mutações benignas que na PCR-ASO seriam erroneamente interpretadas como $\Delta F508$, e tendo em vista que o prazo de três a cinco dias para a liberação do resultado não seria a nosso ver excessivo, caso tivéssemos que escolher entre as duas técnicas, optaríamos pela realização da PCR clássica no caso específico da detecção da deleção $\Delta F508$.

As Reações em Cadeia da Polimerase padronizadas neste projeto de pesquisa abrem novas perspectivas aos pacientes portadores de Fibrose Cística, pois o LIM/36 já iniciou a padronização de outras onze mutações associadas à doença, e pretende colocar estas técnicas em rotina, tão logo tenham sido validadas. São elas: $\Delta I507$, F508C, 1717-1G $\rightarrow$ A, R117H, 621+1G $\rightarrow$ T, W1282X, G551D, R553X, G542X, R560T e N1303K. A análise deste painel de mutações poderia, a nosso ver, ser suficiente para obter-se o diagnóstico em uma porcentagem significativa dos pacientes (cerca de 80-90%).

Entretanto, devido à maior miscigenação racial existente na população brasileira, é possível que a frequência das doze mutações mais comuns em países europeus e nos Estados Unidos seja mais baixa em nosso meio, e

ainda, que existam mutações “novas” em nossa população, o que diminuiria o poder diagnóstico de um painel de exames que incluísse a detecção da deleção da $\Delta F508$, além das outras onze acima citadas.

É importante lembrar da possibilidade de num futuro próximo, a determinação do genotipo associado à FC torne-se obrigatória para garantir o fornecimento dos medicamentos de alto custo a estes pacientes (DNase e enzimas pancreáticas).

CONCLUSÕES

A determinação da frequência da deleção $\Delta F508$ nos 108 pacientes incluídos neste estudo nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

1. a frequência desta mutação é significativa em nossos pacientes (44,45%), muito embora exista uma maior miscigenação racial nas populações brasileiras.
2. esta frequência é semelhante àquela encontrada em outros estudos brasileiros, todos realizados nas regiões sudeste e sul do país. No entanto, ela é muito inferior aos 70% encontrados em alguns países europeus e em estudos norte americanos.

3. as duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) propostas para este estudo foram padronizadas e validadas com sucesso, pois comprovou-se que apresentam especificidade, reprodutibilidade e acurácia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKANE, A.; MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, H.; TAKAHASHI, S.; KIMURA, K. Identification of the heme compound co-purified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood stains, a major inhibitor of PCR. **J. Forensic Sci.**, v.39 p. 362-72, 1994.
- AMMERMAN, A.J.; CAVALLI-SFORZA, L.L. **The neolithic transition and the genetics of population in Europe**. Princeton, Princeton University Press, 1984.
- AMOS, J.A.; JANES, S.R.; ERBE, R.W. DNA analysis of cystic fibrosis genotypes in relatives with equivocal sweat test results. **Clin. Invest Med.**, v.13, p.1-5, 1990.
- ANDERSEN, DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. **Am. J. Dis. Child.**, v.56, p.344-99, 1938.
- ANGUIANO, A.; OATES, R.D.; AMOS, J.A.; DEAN, M.; GERRARD, B.; STEWART, C.; MAHER, T.A.; WHITE, M.B.; MILUNSKI, A. Congenital

bilateral absence of the vas deferens: a primarily genital form of cystic fibrosis. **JAMA**, v. 267, p.1794-7, 1992.

AUGARTEN, A.; KEREM, B-S .; YAHAV, Y.; NOIMAN, S.; RIVLIN, Y.; TAL, A.; BLAU, H.; BEM-TUR, L.; SZEINBERG, A.; KEREM, E.; GAZIT, E. Mild cystic fibrosis and normal or borderline sweat test in patients with the 3849 + 10 KbC -> T mutation. **Lancet**, v.342, p. 25-6, 1993.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v.196, p.80-3, 1991.

CHONG, GL.; THIBODEAU, SN. A simple assay for the screening of the cystic fibrosis allele in carriers of the Phe508 deletion mutation. **Mayo Clin. Proc.**, v.65, p.1072-6, 1990.

CUTTING, G.R.; KASCH, L.M.; ROSEINSTEIN, B.J.; ZIELENSKI, J.; TSUI, L-C.; ANTONARAKIS, S.E.; KAZAZIAN, H.H. Jr. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. **Nature**, v.346, p.366-9, 1990.

CYSTIC FIBROSIS GENETIC ANALYSIS CONSORTIUM: Wordlwide survey of the delta F508 mutation – Report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis consortium. **Am. J. Hum. Genet.**, v.47, p.354-9, 1990.

CYSTIC FIBROSIS GENOTYPE/PHENOTYPE CONSORTIUM: Correlation between genotype and phenoytpe in cystic fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1308-13, 1993.

DEAN, M.; WHITE, M.B.; AMOS, J.; GERRARD, B.; STEWART, C.; KHAN, K.T.; LEPPERT, M. Multiple mutations in highly conserved residues are found in Mildly affected cystic fibrosis patients. **Cell**, v.61, p.863-70, 1990.

- DESGEORGES, M.; KJELLBERG, P.; DEMAILLE, J.; CLAUSTRES, M. A healthy male with compound and double heterozygosities for delta F508, F508C, and M470V in exon 10 of the cystic fibrosis gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.54, p.384- 5, 1994.
- DI SAINT'AGNASE, P.A.; DARLING, R.C.; PEREIRA, G.A. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. **Am. J. Med.**, v.15, p.777-84, 1953.
- ESTIVILL, X.; CHILLON, M.; CASALS, T.; BOSCH, A.; MORRAL, N.; NUNES, V.; GASPARINI, P.; SEIA, A.; PIGNATTI, P.F.; NOVELLI, G.; DALLAPICOLLA, B.; FERNANDEZ, E.; BENITEZ, J.; WILLIAMSON R. Delta F508 gene deletion in cystic fibrosis in Southern Europe. **Lancet**, v.29, p.1404, 1989.
- EUROPEAN WORKING GROUP ON CF GENETICS: Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. **Hum. Genet.**, v.85,p.436-45, 1990.
- FANCONI, G.; UEHLINGER, E.; KNAUER, C. Das coeliakiessyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und brochiektasien. **Wein Med Wochenschr.**, v.86, p.753-6, 1936.
- FERRIE, R.M.; SCHWARTZ, M.J.; ROBERTSON, N.H.; VAUDIN, S.; SUPER, M.; MALONE, G.; Little S. Development, multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.51,p.251-62, 1992.
- GERVAIS, R.; DUMUR, V.; RIGOT, J-M.; LAFITTE, J-J.; ROUSSEL, P. ; CLAUSTERES, M.; DEMAILLE, J. High frequency of the R117H cystic fibrosis mutation in patients with congenital absence of the vas deferens. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.446-7, 1993.

- GIBSON, L.E.; COOKE, R.E. A test for concentration of eletrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. **Pediatrics**, v.23, p.545-9, 1959.
- GIBSON, N.J.; GILLARD, H.L.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.M.; NEWTON, C.R.; LITTLE, S. A homogeneous method for genotyping with fluorescence polarization. **Clin. Chem.**, v.43, p.1336-41, 1997.
- HAMOSH, A.; FITZ-SIMMONS, S.C.; MACEK, M.Jr.; KNOWLES, MR.; ROSENSTEIN, BJ.; CUTHING, GR. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in African-american and Caucasians. **J. Pediatr.**, v.132, p.255-9, 1998.
- HIGHSMITH, W.E.; BURCH, L.H.; ZHOU, Z.; OLSEN, J.C.; BOAT, T.E.; SPOCK, A.; GORVOY, J.D.; QUITTELL, L.; FRIEDMAN, K.J.; SILVERMAN, L.M.; BOUCHER, R.C.; KNOWLES, M.R. A novel mutation in the cystic fibrosis gene mutation in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. **N. Engl. J. Med.**, v.331, p.974-80, 1994.
- KEREM E.; COREY M.; KEREM B.; ROMMENS J.; MARKIEWICZ D.; LEVISOM H.; TSUI L-C.; DURIE P. The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation $\Delta F508$. **N. Engl. J. Med.**, v 323, p.1517-23, 1990.
- KEREM, E.; KEREM, B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, v.22, p.387-95, 1996.
- KOBAYASHI, K.; KNOWLES, M.R.; BOUCHER, R.C.; O'BRIEN, W.E.; BEAUDET, A L. Benign missense variations in the cystic fibrosis gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.47, p.611-5, 1990.

- KOCH C.; CUPPENS H.; RAINISIO M.; MADESSANI U.; HARMS H.K.; HODSON M.E.; MASTELLA G.; NAVARRO J.; STRANDVIK B.; McKENZIE S.G. European epidemiologic registry of cystic fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. **Pediatric Pulmonol.**, vol 31, p 1-12, 2001.
- LEGRYS, V.A. Sweat testing for diagnosis of cystic fibrosis: Practical considerations. **J. Pediatr.**, v.129, p.892-7, 1996.
- LEMNA, W.K.; FELDMAN, G.L.; KEREM, B.; FERNBACH, S.D.; ZEYKOVICH, E.P.; O'BRIEN, W.E.; RIORDAN, J.R.; COLLINS, F.S.; TSUI, L-C.; BEAUDET, A.L. Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, v.322, p.291-6, 1990.
- LERER, I.; COHEN, S.; CHEMKE, M.; SANILEVICH, A.; RIVLIN, J.; GOLAN, A.; YAHAV, J.; FRIEDMAN A.; ABELEIOVICH, D. The frequency of the delta F508 mutation on cystic fibrosis chromosomes in Israeli families: correlation to CF haplotypes in Jewish communities and Arabs. **Hum. Genet.**, v.85, p.416-7, 1990.
- LIU, J.; LISSENS, W.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM A.; LIEBAERS I. Efficiency and accuracy of Polymerase-Chain-Reaction assay for cystic fibrosis allele $\Delta F508$ in single cell. **Lancet**, v.339, p.1190-2, 1992.
- McINTOSH, I.; LORENZO, M.L.; BROCK, D.J. Frequency of the delta F508 mutation on CF chromosomes in UK. **Lancet**, v.2, p.1404-5, 1989.
- MARÓSTICA, P.J.C.; RASKIN, S.; ABREU-E-SILVA, FA. Analysis of the delta F508 mutation in a Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygous with other patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.529-32, 1998.

- MARTINS, C.S.B.; RIBEIRO, F.; COSTA, F.F. Frequency of the cystic fibrosis delta F508 mutation in a population from São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.1037-40, 1993.
- MASTELLA, G. Relationships between gene mutations and clinical features in Cystic Fibrosis. **Pediatr. Pulmonol.**, v.11, p.63-5, 1995. Supplement.
- MESCHEDE, D.; EJGEL, A.; HORST, J.; NIESCHLAG, E. Compound heterozygosity for the delta F508 and F508C cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutations in a patient with congenital bilateral aplasia of the vas deferens. **Am. J. Hum. Genet.**, v.53, p.292-3, 1993.
- MIEDZYPBRODZKA, Z.H.; YIN, Z.; KELLY, K.F.; Haites, N.E. Evaluation of laboratory methods for cystic fibrosis carrier screening: reliability, sensitivity, specificity, and costs. **J. Med. Genet.**, v.31, p.545-50, 1994.
- MILLER, A.S.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic. Acids. Res.**, v.16, p.1215, 1988.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. **Biotechnology.**, v.24, p.17-27, 1992.
- NOONE, P.G.; OLIVIER, KN.; KNOWLES, MR. Modulation of the ionic milieu of the airway in health and disease. **Annu. Rev. Med.**, v.45, p.421-34, 1994.
- POLI, F.; CATTANEO, R.; CRESPIATICO, L.; NOCCO, A.; SIRCHIA, G. A rapid and simple method for reversing the inhibitory effect of heparin on PCR for HLA class II typing. **PCR Methods Appl.**, v.2, p.356-8, 1993.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISCHNAMANI, M.R., UNENCAK-JONES, C .; PARKER, RA.; DEWESEN, E.; ROZOV, T.; CARDIERI, JM.; MARAROSTICA,P.; ABREU, F.; GUIGLIANI, R.; REIS F.; ROSARIO, NA.; LUDWIG, N.; CULPI, L. Cystic Fibrosis in the Brazilian population: delta F508 mutation and KM-19/XV-2C haplotype distribution. **Hum. Biol.**, v.69, p.499-508, 1997.

RASKIN, S.; PHILLIPS, J.A.; KRISHNAMANI, M.R.S.; UNENCAK-JONES, C.;PARKER, RA.; DEWSEN, E.; ROZOV, T.; CARDIERI, J.M.; MAROSTICA, P.; ABREU, F.; GUIGLIANI, R.; REIS, F.; ROSARIO, N.A.; LUDWIG, N.; CULPI, L. Regional distribution of cystic fibrosis-linked DNA haplotypes in Brazil: Multicenter Study. **Hum. Biol.**, v.69, p.75-88, 1997.

RICH, D.P.; ANDERSON, M.P.; GREGORY, R.J.; CHENG, SH.; PAUL, S.; JEFFERSON, DM.; McCANN J.D.; KLINGER, K.W.; SMITH, A.E.; WELSH, M.J. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Nature**, v.347, p.358-63, 1990.

RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.M.; KEREM, B.; ALON, N.; ROZMAHEL, K.; GRZELCZAK, Z.; ZIELENSKI, J.; LOK, S.; PLAYAR, N.; CHOU, JL . Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v.245, p.1066-73, 1989.

RIOS J.; ORELLANA O ; ASPILLAGA M.; AVENDANO I.; LARGO I.; RIVEROS N. CFTR in chilean cystic fibrosis patients. **Hum Genet.**, v. 94, p. 291-4, 1994.

ROBERTSON, N.H.; WESTON, S.L.; KELLY, S.J.; DUXBURY, N.J.; PEARCE, S.R.; ELSMORE, P.; WEBB, M.B.T.; NEWTON, C.R.; LITTLE, S. Development and validation of a screening test for 12 common mutations of the cystic fibrosis CFTR gene. **Eur. Respir. J.**, v.12, p.477-82, 1998.

- ROFLS, A.; SCHULLER, I.; FINCK H.; WEBER-ROFLS U. **PCR: clinical diagnostics and research**. Berlin, Springer-Verlag, 1999. p. 51-60: Substances affecting PCR : inhibition and enhancement.
- ROSEINSTEIN, B.J.; CUTTING, G.R. The diagnosis of cystic fibrosis : a consensus statement. **J. Pediatr.**, v.132, p.589-95, 1998.
- SAIKI, R.K.; SCHARF ,S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia **Science**, v.230, p.1350-4, 1985.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-91, 1988.
- SCHWARTZ, M.; JOHANSEN, H.K.; KOCH, K.; BRANDT, N.J. Frequency of the delta F508 mutation on cystic fibrosis chromosomes in Denmark. **Hum. Genet.**, v.85, p.427-8, 1990.
- SCHWARTZ, M.; SUMMERS, C.; HEPTINSTALL, L.; Newton, C.; MARKHAM, A.; SUPER, M. A deletion mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) locus: delta I507. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.290,p.393-8, 1991.
- SERRE, J.L.; SIMON-BUOY, B.; MORNET, E.; JAUME-ROIG, B.; BALASSOPOULOU, A.; SCHWARTZ, M.; TAILLANDIER, A.; BOUÉ, J.; BOUÉ, A. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in population genetics. **Hum. Genet.**, v.84, p.449-54, 1990.

SMITH, J.J.; TRAVIS, S.M.; GREENBERG, E.P.; WELSH, M.J. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface liquid. **Cell**, v.85, p.229-36, 1996.

STERN, R.C.; BOAT, T.F.; ABRAMOWSKY, C.R.; MATTHEWS, L.W.; WOOD, R.E.; DOERSHUK, C.R. Intermediate-range sweat chloride concentration and pseudomonas bronchitis. A cystic fibrosis variant with preservation of exocrine pancreatic function. **JAMA**, v.239, p.2676-80, 1978.

STERN, R.C.; BOAT, T.F.; DOERSHUK, C.F. Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. **Lancet**, v.1, p.1401-4, 1982.

STREIT C.; BURLAMAQUE NETO AC., SILVA F.A ; GIUGLIANI R.; PEREIRA M.L.S. CFTR gene : molecular analysis in patients from south Brazil. **Mol. Gen. and Metabol.** , v 78 , 259-64, 2003.

STRONG, T.V.; SMIT, L.S.; TURPIN, S.V.; COLE, J.L.; HON, C.T.; MARKIEWICZ, D.; PETTY, T.L.; CRAIG, M.W.; ROSENOW, E.C.; TSUI, L-C.; IANNUZZI, M.C.; KNOWLES, M.R.; COLLINS, F.S. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. **N. Engl. J. Med.**, v.325, p.1630-4, 1991.

TSUI, L.C. The spectrum of cystic fibrosis mutations. **Trends Genet.**, v.8, p.392-8, 1992.

TSUI, LC.; BUCHWALD M. Cystic fibrosis **Ann. Med. Genet.** , v 24, p. 192-245, 1992.

WELSH M.; SMITH A.E. Molecular mechanisms of CFTR : chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell** ,v 73, p1251-4, 1993.

WELSH, M.; TSUI, L.C.; BOAT, T.F.; BEAUDET, A.L. Cystic fibrosis. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S. **The metabolic and**

molecular bases of inherited disease. 7.ed. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 3799-877.

WILSCHANSKI M.; ZIELINSKI J.; MARKIEWICZ D.; TSUI LC.; COREY M.; LEVISON H.; DURIE PR. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. **J. Pediatrics**, v127 n 5, p. 705-10, 1995.

ZIELENSKI, J.; BOZON, D.; KEREM, B.; MARKIEWICZ, D.; DURIE, P.; ROMMOMMENS, J.M.; TSUI, L-C. Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. **Genomics**, v.10, p.229-35, 1991.

ZIELENSKI, J.; ROZMAHELI, R. ; BOZON, D , KEREM B , GRYRZELCZAK Z ,RIORDAN, J.R.; ROMMENS, J.; TSUI, L.C. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. **Genomics**, v.10, p.214-28, 1991.

ANEXOS

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO (SEGUNDO MILLER ET AL., 1988)

A extração é iniciada com 2 ml de sangue total colhido em tubo com EDTA (marca BD). A seguir, a amostra é homogenizada, e acrescenta-se 7 ml do tampão de lise de hemácias (“blood lysis buffer”). O volume total é transferido para um tubo plástico de 50 ml (Falcon), colocado no gelo por 30 minutos para obter-se a lise total de eritrócitos. A amostra é então centrifugada 15 minutos a 4^oC , na velocidade de 1.800 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall, modelo RT-6000 B). Em seguida, o sobrenadante é descartado e acrescenta-se mais 2 ml do tampão de lise de hemácias (“blood lysis buffer”) ao precipitado de células (“pellet”), formado no fundo do tubo. A amostra é então homogenizada no vortex para a eliminação do máximo de pigmento vermelho e restos de eritrócitos. A seguir, faz-se uma centrifugação por cinco minutos a 1.800 rpm em centrífuga refrigerada (4^oC), e o precipitado de células é resuspenso em 3 ml do tampão de lise de núcleos (“nuclear lysis buffer”), e procede-se uma homogenização em vortex. Adiciona-se 5 microlitros de

proteínase K na concentração de 20 mg/ml (Sigma ou Life), e homogeniza-se a amostra (a proteínase K vai promover a “digestão de proteínas”). Adiciona-se 300 microlitros de SDS 10% (Merck), e homogeniza-se a amostra novamente. O SDS é um detergente capaz de “abrir” as moléculas de proteínas, expondo-as à ação da proteínase K). Em seguida, faz-se uma incubação até o dia seguinte (“overnight”), a 37°C (ou 2 horas a 56°C). A solução deve ficar clara e viscosa. Adiciona-se 1 ml de NaCl saturado 6M (Merck ou Pharmacia), que tem por objetivo provocar uma precipitação de proteínas por meio de uma solução salina super saturada. A seguir, mistura-se a amostra vigorosamente por 15 segundos (a solução deve ficar leitosa). Faz-se então uma centrifugação por 20 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante é transferido para outro tubo de 50 ml, o conteúdo é homogenizado cuidadosamente e novamente centrifugado por 15 minutos a 2.500 rpm em centrífuga refrigerada (4°C). A seguir, o sobrenadante é transferido para um tubo de vidro e o DNA é precipitado por meio da adição de dois volumes de etanol absoluto. O DNA é então “pescado” com a ponta de uma ponteira e lavado com 1 ml de etanol 70% (Merck), transferido para um tubo eppendorf no qual acrescenta-se 300 microlitros de tampão Tris-EDTA na concentração de 10mM/1mM (Merck ou Pharmacia). As amostras de DNA foram armazenadas em congelador (-20°C), divididas em três alíquotas de 100 microlitros.

CÁLCULO DA TEMPERATURA DE FUSÃO DOS PRIMERS (“melting temperature” ou Tm)

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [J^+] + 0,41 (\%G+C) - (600 / L) - 0,63 (\% FA)$$

Onde: 81,5 = constante

16,6 ($\log_{10} [J^+]$) = 20,3 para todas as PCR deste projeto

$[J^+]$ = concentração dos cations monovalentes

L= comprimento do oligonucleotídeo

FA = formamida ou outro co-solvente (caso seja utilizado)

A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Trata-se de um método de amplificação de DNA descrito em 1985 por Kary Mullis (Mullis, 1986). Na PCR, a presença de uma enzima DNA polimerase resistente à altas temperaturas chamada de Taq Polimerase, pois foi isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, permite que sejam feitas cópias de fitas de DNA de maneira extremamente eficiente (aumento exponencial). Ao final de n ciclos, e partindo de uma única cópia do DNA alvo da amplificação, pode-se obter 2^n cópias (onde n representa o número de ciclos de amplificação realizados). Teoricamente, partindo-se de uma cópia do DNA que se deseja amplificar e trabalhando-se com um sistema de eficácia máxima, ao final de 30 ciclos de amplificação obter-se-ia 2^{30} cópias, ou seja 10^9 cópias (normalmente esta quantidade de DNA atinge os nanogramas necessários para que o fragmento de DNA seja visualizado em géis de agarose). Devido a um excelente nível de sensibilidade e especificidade, além da rapidez de execução e versatilidade (pode ser adaptada para qualquer tipo de material biológico), a PCR tem sido utilizada em praticamente todas as áreas de pesquisa médica.

PCR “UNIVERSAL” PARA CERTIFICAR A QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO E A AUSÊNCIA DE INIBIDORES DA AMPLIFICAÇÃO

Será utilizada uma PCR para determinar se o DNA extraído pode ser amplificado, isto é, que ele não esteja fragmentado em decorrência de uma extração inadequada, ou ainda que contenha inibidores da amplificação tais como os produtos de degradação da hemoglobina (Akane et al, 1994)., e macromoléculas com a heparina (Poli et al, 1993). Este PCR foi realizado com primers oriundos do gene que codifica a Beta-Actina Humana : primer sense 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACC-3' e primer anti-sense 5'-CTCCTTATTGTCACGCACGATTTC-3'. A concentração de reagentes ficou assim estabelecida: 200 uM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 0,4 uM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase em 50 ul de volume final de reação (recobertos com 50 ul de óleo mineral “light” para evitar evaporação). As amplificações foram realizadas em um termociclador da marca MJ Research (“Minicycler”), pertencente ao Laboratório do ICr, de acordo com o seguinte protocolo: etapa de denaturação inicial de 3 minutos a 95^oC; 30 ciclos de 30 segundos a 95^oC, 30 segundos a 58^oC e 1 minuto a 72^oC. A seguir, uma etapa de extensão final de cinco minutos a 72^oC. Esta PCR (que chamaremos de universal), produz um fragmento de 500 bp. A situação desejável é que esta PCR resulte positiva para todas as amostras de DNA a serem analisadas. Caso isto não tivesse ocorrido, faríamos uma nova extração. As outras PCR (específicas para

análise de mutações e deleções), só foram realizadas após a comprovação de que as amostras eram “amplificáveis”.