**ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE CFTR**

Faculdades Pequeno Príncipe

Franciele Bona Verzeletti 1

Carolina Cardoso de Mello Prando 2

Roberto Rosati 3

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (*CFTR*), localizado no cromossomo 7q31. Do ponto de vista clínico, a doença, que é caracterizada pela tríade tripsina imunorreativa (IRT), teste do suor e diagnóstico genético-molecular, apresenta-se, na maioria dos casos, assintomática ao nascimento. Assim, o teste de triagem neonatal para FC é crucial para o diagnóstico precoce. No Brasil, o teste de triagem para FC é feito pelo método da dosagem de IRT. Em seguida, recém-nascidos com IRT compatível para FC são encaminhados para confirmação pelo teste do suor. A conclusão do diagnóstico, pela caracterização genético-molecular da FC é realizada pelo achado de mutações no gene *CFTR*. A identificação da mutação tem importância para aconselhamento genético e orientação de seguimento clínico, melhorando o prognóstico e, principalmente, aumentando a sobrevida e qualidade de vida do paciente. A identificação de mutações específicas é importante também no tratamento de pacientes com FC, uma vez que já existem medicamentos mutação-dirigidos. Estes medicamentos funcionam como potenciadores (ivacaftor), promovendo a abertura do canal CFTR que está na superfície da célula, ou como corretores (ivacaftor-lumacaftor), que ajudam o canal CFTR a chegar até a superfície da células. O medicamento ivacaftor pode ser prescrito a pacientes maiores de 2 anos de idade que apresentam as seguintes mutações: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, ou S549R. Para pacientes com a mutação homozigota para ΔF508 a medicação indicada é a combinação ivacaftor-lumacaftor. A identificação de mutações no *CFTR* é crescente e hoje conta com mais de 1.900 mutações publicadas. A causa mais frequente de FC é uma deleção de três nucleotideos (CTT) no exon 10 do gene *CFTR*, que inclui a última citosina (C) da isoleucina 507 (Ile507ATC) e duas timinas (T) da fenilalanina 508 (Phe508TTT). As consequências da eliminação são a perda da fenilalanina na posição 508 da proteína CFTR (ΔF508) e mudança de códon da isoleucina 507 de ATC para ATT (Ile507ATT). As mutações são divididas em classes funcionais, cada uma atuando em um estágio diferente da síntese de proteínas. As mutações ΔF508 e ΔI507 pertencem a classe funcional II, onde a proteína mutante não passa pelo processo de maturação e é degradada antes de atingir a superfície da célula epitelial apical. Segundo dados de 2014 do Registro Brasileiro de Fibrose Cística, a mutação ΔF508, em homozigose ou heterozigose, está presente em 1.523 (47,48%) pacientes brasileiros e apenas 4 possuem a mutação ΔI507 (0,12%). Como não há uniformidade nas técnicas utilizadas no diagnóstico desses pacientes, interrogamos se o percentual de pacientes com a mutação ΔI507 pode estar subestimado, uma vez que técnicas de separação em gel de poliacrilamida não distinguem ΔF508 de ΔI507. Neste estudo, propomos o uso da técnica de amplificação refratária de mutação (do inglês *Amplification-refractory mutation system* ARMS-PCR) para identificar: 1) pacientes com sem mutação nas posições 507 e 508; 2) ΔF508; 3) ΔI507. Na técnica ARMS-PCR são desenhados primers em que a última base na extremidade 3’ corresponde à diferença pontual entre sequência normal ou mutada. A técnica baseia-se, portanto, na especificidade de amplificação e de hibridização dos primers específicos aos alelos de interesse. A presença ou ausência do produto de PCR específico é de diagnóstico para a presença ou ausência do alelo alvo. A amplificação de uma região de controle com primers não alelo-específicos permite a distinção entre ausência da mutação e falha na amplificação, minimizando o risco de falsos-negativos. O protocolo base desta técnica descreve o desenvolvimento e aplicação de um teste para diagnostico de uma única mutação, porém, estende-se a protocolos alternativos para a análise de duas ou mais mutações, como foi o caso do nosso estudo. A padronização da técnica ARMS-PCR mostrou-se eficaz na detecção da presença ou ausência de mutações no segmento estudado, além de diferenciar entre ΔI507 e ΔF508 com rapidez e baixo custo, e será aplicada nos protocolos de caracterização genético-molecular dos pacientes com FC em projeto de pesquisa em andamento.

**Palavras-chave:** Fibrose cística; ARMS-PCR; CFTR; Mutações.