

Artigo Original

Original Article

Micaela Guardiano¹
Luísa Guedes Vaz²

Fibrose quística – Caracterização clínica de uma amostra de doentes portugueses

Cystic fibrosis – Clinical features of a sample of portuguese patients

Recebido para publicação/received for publication: 04.11.25
Aceite para publicação/accepted for publication: 05.06.22

Resumo

Apesar dos rápidos avanços na compreensão dos determinantes moleculares da fibrose quística, esta continua a ser uma das doenças recessivas letais mais comuns na população caucasiana em todo o mundo. A realidade dos doentes portugueses continua a ser pouco conhecida, pela escassez de trabalhos publicados referentes à nossa população. Este trabalho tem como objectivos: fazer uma avaliação clínica de um grupo de doentes portugueses com fibrose quística, com 2 mutações identificadas e comparar a apresentação clínica de um grupo de doentes homozigóticos para a mutação F508del com doentes não homozigóticos para esta mutação. Para tal, seleccionou-se um grupo de doentes em seguimento na Consulta de Pneumologia Pediátrica

Abstract

Even though there have been rapid advances in the comprehension of molecular determinants of Cystic Fibrosis, this disease continues to be one of the most common lethal recessive diseases in the Caucasian population worldwide. The reality of Portuguese patients is still greatly unknown, due to the lack of studies published in reference to our population. The objectives of this study were: clinical evaluation of a group of Portuguese patients with Cystic Fibrosis, with two identified mutations; comparing the clinical presentation of a group of homozygous patients for the F508del mutation with patients that are not homozygous for this mutation. A group of patients, followed in Pediatric Pneumo-

¹ Interna Complementar de Pediatria, Departamento de Pediatria/Complementary Paediatrics Intern, Paediatrics Department

² Chefe de Serviço, Departamento de Pediatria/Department Head, Paediatrics Department
Departamento de Pediatria/Paediatrics Department
Director de Departamento/Department Director: Prof. Doutor Álvaro Aguiar
Hospital de S. João, Porto

do HSJ que foram caracterizados do ponto de vista fenotípico e classificados de acordo com critérios de gravidade.

Todos os doentes desta amostra apresentaram mutações de classe I e/ou II, que se associam, classicamente, a fenótipo mais grave. Em conformidade com a gravidade genotípica, todos os doentes apresentaram um fenótipo de insuficiência pancreática mas com maior variabilidade de manifestações pulmonares.

Não se encontraram variações significativas em termos de idade de diagnóstico, formas de apresentação e gravidade da doença entre doentes homozigóticos F508del e restantes doentes. Em contrapartida, doentes com o mesmo genótipo (homozigóticos F508del) apresentaram diferentes espectros de manifestações clínicas e de gravidade fenotípica. Tanto ou mais do que a caracterização genotípica, o tempo de evolução da doença e os factores externos (nomeadamente a sujeição a estímulos infecciosos) deverão interferir na gravidade do fenótipo num dado momento.

Rev Port Pneumol 2005; XI (4): 381-406

Palavras-chave: Fibrose quística, fenótipo, genótipo.

logy Consultations of S. João Hospital, were characterised in terms of phenotype and were classified according to criteria of severity.

All of the patients in this group presented class I and/or II mutations, classically associated with a more severe phenotype. In conformity with the severe genotype, all patients presented a phenotype of pancreatic insufficiency but with greater variability of pulmonary manifestations.

Significant variations were not found in terms of age at diagnosis, presenting forms and disease severity between F508del homozygous patients and the other patients. On the other hand, patients with the same genotype (homozygous F508del) presented different spectrums of clinical manifestations and phenotype severity.

Just as much, or even more than the genotype characterisation, the time period of evolution of the disease and external factors, namely being subjected to infectious stimulus, interfere in the severity of the phenotype, at a certain moment in time.

Rev Port Pneumol 2005; XI (4): 381-406

Key-words: Cystic fibrosis, phenotype, genotype.

Introdução

A fibrose quística (FQ) é a doença autossómica recessiva grave mais frequente nas populações caucasianas, com uma incidência de 1 em 2500 nados-vivos e uma frequência de portadores de 1:25.¹

Apesar dos rápidos avanços na compreensão dos seus determinantes moleculares e de terem passado 15 anos desde a clonagem do gene^{2,4}, a FQ continua a ser uma das doenças recessivas letais mais comuns na população caucasiana em todo o mundo¹.

O gene responsável pela doença contém 27 exões, tem 189 kb e codifica uma proteína com 1480 aminoácidos.^{2,4,5} A proteína, designada *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)⁶, actua como um canal de iões cloreto e encontra-se localizada na membrana apical das células epiteliais.⁷

Mais de 1300 mutações foram, até à data, detectadas no gene CFTR (www.genet.sickkids.on.ca/cftr).

O estudo da distribuição de mutações FQ na Europa permitiu demonstrar que apenas 5 apresentavam uma frequência superior a 1%: F508del, G542X, N1303K, G551D, W1282X.⁸ A frequência da mutação F508del apresenta uma ampla variação, desde cerca de 73 %, nos países do Norte e Centro da Europa (máximo de 87,2 % na Dinamarca), até 57 % na região do Mediterrâneo.⁸ Por outro lado, enquanto a mutação F508del foi encontrada em todas as populações estudadas, as outras quatro mutações apenas se encontraram em algumas populações.¹

Em 1993, Welsh e Smith propuseram a classificação das diferentes mutações em quatro classes, de acordo com o nível de alteração da proteína CFTR⁹, modelo esse que é actualmente aceite.¹⁰ As mutações de classe I constituem cerca de metade do total

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is a serious autosomal recessive disorder which occurs more frequently in Caucasian populations, with an incidence of 1 in 2500 live births and has a 1:25¹ rate of carriers.

Despite great strides having been made in the understanding of its molecular makeup and of fifteen years having passed since the first gene was cloned^{2,4}, CF is still one of the more common lethal recessive diseases in the Caucasian population world wide¹.

The gene responsible for the disease has 27 exons, 189 kb and its coding sequence has a protein with 1480 amino acids.^{2,4,5} The *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)⁶ protein acts as a channel for chloride ions and is found in the apical membrane of the epithelial cells.⁷

Over 1300 mutations of the CFTR gene have so far been detected (www.genet.sickkids.on.ca/cftr).

The study of the distribution of the CF mutations in Europe shows that only 5 have more than 1% frequency: F508del, G542X, N1303K, G551D, W1282X.⁸ The frequency of the F508del mutation shows a wide variation, around 73% in northern and central European countries (maximum of 87.2% in Denmark), to 57% in the Mediterranean region.⁸ On the other hand, while the F508del mutation was found in all the populations studied, the other four mutations are found only in some populations.¹

In 1993 Welsh and Smith proposed classifying the different mutations into four classes, according to the level of alteration in the CFTR protein⁹, and this is the model that is accepted nowadays.¹⁰ The class I mutations make up around half of the total and lead to defects in mRNA synthesis, with loss

A FQ continua a ser uma das doenças recessivas letais mais comuns na população caucasiana em todo o mundo

Welsh e Smith propuseram a classificação das diferentes mutações em quatro classes

Os estudos de correlação entre genótipo e fenótipo clínico (...) têm constituído uma tarefa difícil

e conduzem a defeitos na síntese do ARNm, com perda de proteína ou de função.^{11,12}

Nas mutações de classe II as proteínas CFTR mutantes são retidas ao nível do retículo endoplasmático e sofrem rápida degradação.^{11,12}

Nas mutações de classe III há uma perturbação da activação e da regulação da proteína CFTR ao nível da membrana plasmática.^{11,12}

O canal pode apresentar um defeito na ligação ao ATP e hidrólise ou na fosforilação.

As mutações da classe IV caracterizam-se pela redução da condução de cloreto, em resposta ao AMPc. São mutações associadas a suficiência pancreática e fenótipo ligeiro.^{11,12}

Os estudos de correlação entre genótipo e fenótipo clínico, com o objectivo de melhor compreender a patologia FQ, têm constituído uma tarefa difícil, pelo facto de muitos dos doentes serem heterozigóticos compostos e também pela variabilidade clínica das manifestações. No entanto, sabe-se que as mutações de classe I, II e III, em doentes homozigóticos, dão lugar a um fenótipo grave com insuficiência pancreática (fenótipo IP) e as mutações de classe IV, em que persiste uma significativa função do canal de cloreto, apresentam fenótipos menos graves, menor mortalidade¹¹ e, frequentemente, suficiência pancreática (fenótipo SP).^{13,14,15}

Por outro lado, a doença hepática e a diabetes *mellitus*, não parecem ser geneticamente determinadas¹⁶, embora alguns estudos tenham sugerido que a diabetes *mellitus* seja mais frequente em doentes homozigóticos F508del.¹⁷

Em relação à concentração de cloreto no teste de suor, os seus níveis estão substancialmente aumentados, quer em doentes com insuficiência pancreática, quer nos suficientes pancreáticos.¹⁸

O fenótipo clássico da FQ, com insuficiência

either of protein or of function.^{11,12}

In class II mutations the mutant CFTR proteins are found in the endoplasmatic reticulum and quickly degrade.^{11,12}

In class III mutations there is a disturbance in the activation and regulation of the CFTR protein in the plasmatic membrane.^{11,12} The channel may have a defect in the connection to the ATP and hydrolysis or in the phosphorylation.

The class IV mutations are characterised by a reduction in the transport of chloride in response to AMPc. They are mutations associated with pancreatic sufficiency and mild phenotype.^{11,12}

It has been difficult to undertake correlation studies between the clinical genotype and phenotype which aim at a better understanding of CF pathology as many of the patients are heterozygous and also because of the clinical variations in the findings. It is known, however, that class I, II and III mutations in homozygous patients give rise to a severe phenotype with pancreatic insufficiency, (phenotype IP) and the class IV mutations, in which a significant function of the chloride channel persist, have less severe phenotypes, less mortality¹¹ and frequently pancreatic sufficiency (phenotype SP).^{13,14,15} Hepatic disease and diabetes mellitus, on the other hand, do not seem to be genetically determined¹⁶, although some studies have suggested that diabetes mellitus is more common in patients homozygous for the F508del mutation.¹⁷

The levels of chloride in the sweat analysis proficiency test are considerably higher, both in patients with pancreatic insufficiency and pancreatic sufficiency.¹⁸

The classic SF phenotype, with pancreatic insufficiency, male infertility, progressive lung

pancreática, infertilidade masculina, doença pulmonar progressiva e concentração elevada de iões no suor, associa-se à presença de mutações graves (a F508del é a mutação tipo) em ambos os cromossomas.^{14,19} Nestes casos, geralmente o diagnóstico é feito na infância. As dificuldades no diagnóstico podem surgir quando se encontra um doente com, pelo menos, uma mutação leve, uma vez que o espectro clínico da doença pode variar amplamente, com ausência de clínica digestiva, com fertilidade e, inclusivamente, com um teste de suor normal.

A hipótese que se coloca é de que o genótipo determina a quantidade de proteína funcional e, como consequência, a expressão da doença a nível dos órgãos-alvo. Para que o pâncreas seja afectado deve haver menos de 1 % de proteína CFTR normal, as glândulas sudoríparas são afectadas com menos de 5 % de proteína, existe clínica pulmonar com menos de 4,5 % e ausência congénita de vasos deferentes com menos de 10 % de proteína normal.^{14,20}

No entanto, o fenótipo da FQ não é apenas determinado pelas mutações no gene da CFTR, mas também pelo contexto genético no qual se encontra e por factores externos, tanto químicos como bacterianos.^{21,22} A contribuição relativa destes factores é específica de cada tecido, de modo que os vasos deferentes parecem ser os mais sensíveis às mutações da CFTR, enquanto a evolução da doença pulmonar vem determinada, em grande medida, pela exposição do doente a distintos agentes ambientais.²⁰

No que se refere ao contexto genético, foi introduzido o conceito de “gene modificador”.^{15,21,23}

disease and high concentration of ions in sweat is associated with the presence of severe mutations (F508del being the mutation type) in both the chromosomes.^{14,19} In these cases, the diagnosis is usually made in childhood. Difficulties in diagnosis can arise when there is a patient with at least a mild mutation, seeing as the disease’s clinical spectrum can vary widely with absence of gastrointestinal disease, no infertility, and inclusively with a normal sweat analysis proficiency test.

The hypothesis is that the genotype determines the quantity of the functioning protein and as a consequently, the expression of the disease at the level of the target organs. In order for the pancreas to be affected, there must be less than 1% of normal CFTR protein. The sudoriparous glands are affected when there is less than 5% protein; there is clinical pulmonary disease when there is less than 4.5% normal protein and congenital absence of the deferential veins when there is under 10%.^{14,20}

The CF phenotype, however, is not solely determined by mutations in the CFTR gene, but also by its genetic context and by external factors, both chemical and bacterial.^{21,22} The relative contribution of these factors is specific to each tissue, and as such the deferential veins seem to be the most sensitive to CFTR mutations while the evolution of the lung disease seems largely determined by the patient’s exposure to specific environmental agents.²⁰

The concept of the “gene modifier”^{15,21,23} has become part of the genetic context.

The situation in Portugal

Although no data has been published on the true rate of CF in Portugal, it is thought that

O genótipo determina a quantidade de proteína funcional e, como consequência, a expressão da doença, a nível dos órgãos alvo

A realidade em Portugal

Embora não existam dados publicados sobre a verdadeira incidência da FQ no nosso país, estima-se que esta seja inferior à referida noutros países, devendo aproximar-se de 1 para 4000 (Pacheco P, comunicação livre). Calcula-se que 25 a 30 novos casos sejam diagnosticados, por ano, em Portugal (Núcleo Português de FQ, 1996).

Relativamente à frequência das diferentes mutações, a F508del apresenta uma frequência inferior à de outros países da Europa e América do Norte (52 %) e encontram-se outras mutações raras ou mesmo exclusivas da população portuguesa.^{22,24-26} É o caso da mutação A561E, uma mutação *missense* descrita apenas em Portugal, onde foi encontrada em cerca de 3 % dos genes FQ. Desta forma, constitui a segunda mutação mais frequente no nosso país. Foram identificados 14 doentes portadores desta mutação em Portugal. Nove doentes são heterozigóticos compostos com F508del, um com G542X e quatro homozigóticos para a mutação A561E (Pacheco P, comunicação livre).²²

Outras mutações igualmente raras ou exclusivas da nossa população são a R1066C (2,8 %), a R334W (2,8 %), a G542X (2,6 %), a 8751 G > T no intrão 6a e a 3272-26 A > G no intrão 17a.²⁷

Existem poucos estudos descritivos relativos à população portuguesa²⁸, o que faz com que se desconheça, em grande medida, a verdadeira realidade desta patologia em Portugal, nomeadamente no que se refere ao diagnóstico, à forma de apresentação, à evolução clínica e ao prognóstico dos doentes.

incidence here is lower than that reported in other countries, and is approximately 1 in 4000 (Pacheco P, private communication). It is believed that 25 to 30 new cases are diagnosed per year in Portugal (Núcleo Português de FQ, 1996).

As to the rate of the different mutations, the F508del has a lower rate than other European countries and North America (52%) and other rare mutations or even mutations exclusive to the Portuguese population are found.^{22,24-26} This is the case with mutation A561E, a *missense* mutation found only in Portugal, where it has been found in around 3% of CF genes. It is thus the second most common mutation found in Portugal. 14 patients who are carriers of this mutation have been identified in Portugal. Nine patients are heterozygous for the F508del mutation, one has G542X and four patients are homozygous for the A561E mutation (Pacheco P, private communication).²²

Other equally rare or exclusive mutations in Portugal are the R1066C (2.8%), the R334W (2.8%), the G542X (2.6%), the 8751 G > T in the 6a intron and the 3272-26 A > G in the 1a intron.²⁷

There are very few studies involving the Portuguese population,²⁸ meaning that in the main a full picture of this pathology in Portugal is not known, especially as to diagnosis, the disease's presentation, its clinical evolution and the prognosis in patients.

Aims

This study aims to draw up a clinical characterisation of a group of Portuguese patients with CF and study the genotype-phenotype correlation in two sub-groups of patients. Group A consists of patients homozygous for the F508del mutation and group B is

Existem poucos estudos descritivos relativos à população portuguesa

Objectivos

Pretende-se com este trabalho efectuar a caracterização clínica de um grupo de doentes portugueses com FQ e estudar a correlação genótipo-fenótipo em dois subgrupos de doentes: grupo A, doentes homozigóticos para a mutação F508del, e grupo B, doentes não homozigóticos para esta mutação, mas com mutações identificadas nos dois genes CFTR. Serão avaliados e comparados nestes dois grupos a forma e a idade de apresentação clínica, a evolução da doença e a gravidade de acordo com os *scores* de Shwachman e de Brasfield.

Material e métodos

Seleção da amostra

- A selecção dos doentes foi feita com base na consulta de Processos Clínicos, sendo seleccionados apenas aqueles com duas mutações FQ identificadas. Estes doentes foram seleccionados para um estudo mais abrangente que incluiu a determinação de marcadores de *stress* oxidativo e constituem o subgrupo que aceitou participar nesse projecto, de entre o total de doentes com FQ em seguimento no Departamento de Pediatria do Hospital de S. João (n=43). Foram excluídos doentes com diagnóstico de FQ mas sem identificação de duas mutações associadas à doença (n=10).
- O grupo de doentes foi subdividido em grupo A (homozigóticos F508del) e grupo B (outros doentes).
- Para cada doente foram avaliados os seguintes parâmetros: idade, sexo, genótipo, idade das primeiras manifestações, idade de diagnóstico, manifestações clínicas iniciais, outras manifestações, valor médio

composto de patients who are non homozygous for this mutation, but with mutations identified in the two CFTR genes. The form and time of the clinical presentation, the evolution of the disease and its severity according to the Shwachman and Brasfield scores in these two groups will be evaluated and compared.

Patients and methods

Selection of the sample

- The patients were selected based on their chart review and singled out those with two identified CF mutations. These patients were chosen for a more wide-ranging study which included determining oxidative stress markers which made up the sub group that agreed to take part in this project from amongst the total of CF patients monitored at the Paediatrics Department of S. João Hospital (n=43). Excluded were patients diagnosed with CF but in whom no identification of the two mutations associated with the disease had been made (n=10).
- The patient group was subdivided into group A (homozygous for the F508del mutation) and group B (other patients).
- Each patient had the following parameters evaluated: age, sex, genotype, date of first symptoms, date of diagnosis, initial clinical signs, average value of the sweat analysis proficiency test (when done), pancreatic function (sufficient or insufficient), FEV1 and FVC, and colonising agents of the respiratory tracts.
- The evaluation criteria mentioned above were compared between the two groups of patients (A and B).

- da prova de suor (quando efectuada), função pancreática (suficiência ou insuficiência), FEV1 e FVC e agentes colonizadores das vias respiratórias.
- Foi efectuada comparação dos critérios de avaliação clínica referidos entre os dois grupos de doentes (A e B).
- A gravidade clínica foi classificada de acordo com o *score* de Shwachman²⁹: 100-86: excelente; 85-71: bom; 70-56: razoável; 55-41: moderado; < 40: severo.
- A gravidade das alterações radiológicas foi classificada de acordo com o *score* de Brasfield^{30,31}: pontuação total = 25 – pontos obtidos (0 a 22: tanto mais pontos quanto maior a gravidade).
- The clinical severity was classified using the Shwachman score²⁹: 100-86: Excellent; 85-71: Good; 70-56: Reasonable; 55-41: Moderate; < 40: Severe.
- The severity of the radiological alterations was classified using the Brasfield score^{30,31}: total points = 25 – points obtained (0 to 22: the more points the higher the degree of gravity).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS (*Statistical Package Social Science*) versão 12.0.

Para comparação entre amostras independentes foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para avaliar a independência entre variáveis foi utilizado o método do qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas a um intervalo de confiança de 95 % (nível de significância de 5 %) com uma probabilidade de erro (p) inferior a 0,05.

Resultados

Foi incluído no estudo um total de 18 doentes com o diagnóstico de FQ confirmado pela presença de duas mutações FQ identificadas, em seguimento na Consulta Externa de Pneumologia Pediátrica. Neste grupo verificou-se predomínio do sexo feminino (61 %), idade média de 8,7 anos, mediana de idades de 7, com idade média na data de diagnóstico de 2,5 anos.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using version 12.0 of the SPSS (*Statistical Package Social Science*) program.

Comparison among independent samples was carried out using the non parametrical Mann Whitney test. The Chi-square method was used to evaluate the independence among variables. The differences considered significant at a confidence level of 95% (significance level 5%) with a probability of error (p) less than 0.05.

Results

A total of 18 patients was included in the study. Their CF diagnosis was confirmed by the presence of two CF mutations identified after an outpatients Paediatric Pulmonology appointment. This group was found to be mainly female (61%) with an average age of 8.7 years, the median of which was 7 and with their average age at the date of diagnosis 2.5 years.

Group A is composed of patients who are homozygous for the F508del mutation and includes ten patients with an average age of 10.8 years, 50% female. The average time at which the disease presented was 7 months and the average age at diagnosis was 27 months (Table I).

The average Brasfield score of the Group A

O Grupo A é constituído pelos doentes homozigóticos para a mutação F508del e inclui dez com idade média de 10,8 anos, 50 % do sexo feminino. A idade média de apresentação da doença foi de 7 meses e a idade média de diagnóstico de 27 meses (Quadro I).

Nos doentes do Grupo A o valor médio do *score* de Brasfield foi de 19 e do *score* de Shwachman de 70,5 (Quadro II).

O Grupo B é constituído pelos doentes não homozigóticos para a mutação F508del (heterozigóticos F508del/outra mutação ou portadores de outras mutações distintas da mais frequente) e inclui oito doentes com idade média de 6,2 anos, 75 % do sexo feminino, idade média de apresentação da doença de 8 meses e idade média de diagnóstico de 36 meses (Quadro III).

Nos doentes do Grupo B o valor médio do *score* de Brasfield foi de 22 e do *score* de Shwachman de 78 (Quadro IV).

O diagnóstico foi feito no primeiro ano de vida em 50 % dos casos, e em 83 % dos doentes a doença foi detectada nos primeiros cinco anos. A idade média do diagnóstico foi de 31 meses. A idade média de apresentação da doença e de diagnóstico foi menor nos doentes homozigóticos F508del, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,831$ e $0,873$, respectivamente).

Em 14 (70 %) doentes as manifestações clínicas iniciais foram do foro respiratório. Em 4 (22 %) doentes observaram-se alterações do trânsito intestinal (diarreia) na apresentação inicial da doença. O atraso de crescimento foi detectado inicialmente em 5 (28 %) doentes.

Todos os doentes foram considerados insuficientes pancreáticos com base na clínica e nos valores de quimiotripsina fecal ($< 6U/g$)

patients was 19 and the Shwachman score 70.5 (Table II).

Group B consists of patients who are non homozygous for the F508del mutation (heterozygous for the F508del/other mutation or carriers of other frequent distinct mutations) and includes eight patients with an average age of 6.2 years, 75% female. The average period at which the disease presented was 8 months and the average age at diagnosis was 36 months (Table III).

The average Brasfield score of the Group B patients was 22 and the Shwachman score 78 (Table IV).

Diagnosis was made in the first year of life in 50% of cases and in 83% of the patients the disease was detected in the first five years. The average age at diagnosis was 31 months. The average period in which the disease presented and the diagnosis made was less in the patients heterozygous for the F508del mutation but the difference was not statistically significant ($p = 0.831$ and 0.873 respectively).

In 14 (70%) patients the initial clinical signs were in the respiratory tract. In 4 (22%) patients changes in bowel pattern (diarrhoea) were seen in the initial presentation of the disease. Delayed growth was initially detected in 5 (28%) patients.

All the patients presented clinical pancreatic insufficiency based on the values of faecal chymotrypsin ($< 6U/g$) and/or faecal elastase ($< 200\mu g/g$).

It was possible to superimpose the values of the sweat proficiency analysis test in the two groups of patients although comparing higher values was difficult as some laboratories show the results of a test as " > 200 ". The cut-off point was considered a value of 200 mOsm/Kg and no significant diffe-

Quadro I – Caracterização clínica do grupo A

Doente	Idade (anos)	sexo	Genótipo	Idade das 1 ^{as} manifestações (meses)	Idade de dx (meses)	Manifestação inicial	Outras manifestações
1	0,5	F	F508del/F508del	2	4	Infecções respiratórias / / Diarreia	-
2	1	M	F508del/F508del	1	3	Infecções respiratórias / / má progressão EP / esteatorreia	Tripsina Imunoreactiva = 114 µg/ml-
3	5	F	F508del/F508del	2	6	Broncospasmo recorrente / má progressão EP / / esteatorreia	Citólise hepática
4	7	M	F508del/F508del	3	5	Broncospasmo recorrente	Polipose nasal Citólise hepática
5	7	M	F508del/F508del	RN	RN	Íleo meconial	-
6	9	F	F508del/F508del	23	24	Imã com FQ	-
7	10	F	F508del/F508del	15	24	Infecções respiratórias	-
8	13	M	F508del/F508del	12	60	Tosse e pieira/esteatorreia e dor abdominal/ / má progressão EP	-
9	25	M	F508del/F508del	9	24	Infecções respiratórias / má progressão EP	ABPA Bronquiectasias
10	30	F	F508del/F508del	5	120	Infecções respiratórias / / esteatorreia	Diabetes <i>mellitus</i> / / Polipose nasal Bronquiectasias

Citólise hepática - elevação assintomática das transaminases séricas; ABPA - Aspergilose broncopulmonar alérgica; EP- estatura-ponderal; F – feminino; M - masculino; RN- recém-nascido; Tripsina imuno-reactiva – normal: < 70 µg/ml

e/ou elastase fecal (< 200µg/g).

O valor da prova de suor foi sobreponível nos dois grupos de doentes, embora a comparação de grandezas seja dificultada pelo facto de alguns laboratórios apresentarem o resultado da prova como “ > 200”. Considerando como valor de *cutt-off* o valor de 200 mOsm/kg, não foram encontradas

renes were found in the diagnostic test between the A and B groups ($p= 1,00$).

The average age of the first *Pseudomonas* infection was 3.4 years in the patients homozygous for the F508del mutation and 9.3 years in the other patients.

FEV₁ as a parameter of the severity of pulmonary disease did not show statistical dif-

Table I – Clinical characterisation of group A

Patient	Age (years)	sex	Genotype	Age at the first manifestations (months)	Age of dx (months)	Initial manifestation	Other manifestations
1	0.5	F	F508del/F508del	2	4	Respiratory infections / Diarrhoea	-
2	1	M	F508del/F508del	1	3	Respiratory infections / under progressing EP / steatorrhoea	Immunoreactive Trypsin = 114 µg/ml--
3	5	F	F508del/F508del	2	6	Reoccurring broncho spasms / under progressing EP / steatorrhoea	Hepatic cytolysis
4	7	M	F508del/F508del	3	5	Reoccurring broncho spasms	Nasal polyps Hepatic cytolysis
5	7	M	F508del/F508del	NB	NB	Ilium meconium	-
6	9	F	F508del/F508del	23	24	Sister with CF	-
7	10	F	F508del/F508del	15	24	Respiratory infections	-
8	13	M	F508del/F508del	12	60	Cough and wheeze/ steatorrhoea and abdominal pain/ under progressing EP	-
9	25	M	F508del/F508del	9	24	Respiratory infections / under progressing EP	ABPA Bronchiectasias
10	30	F	F508del/F508del	5	120	Respiratory infections / steatorrhoea	Diabetic Mellitus / Nasal polyps Bronchiectasias

Hepatic cytolysis – asymptomatic elevation of the serum transaminases; ABPA – Allergic bronchopulmonary aspergillosis; EP- ponderal state; F – female; M - male; NB- new-born; Immunoreactive Trypsin – normal: < 70 µg/ml

diferenças significativas neste teste de diagnóstico entre os grupos A e B ($p = 1,00$). A idade média da primeira infecção por pseudomonas foi de 3,4 anos nos homozigóticos F508del e 9,3 anos nos outros doentes. O FEV₁, como parâmetro de gravidade da doença pulmonar não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois

diferença between the two groups of patients ($p = 0,493$).

The average value of the Brasfield and Shwachman scores was higher in Group B but the difference was not statistically significant ($p = 0.275$ and 0.686 respectively).

A linear correlation between the age of the patients (Group A and B) and the severity

Quadro II – Caracterização clínica do grupo A

Doente	Prova de suor (média) mOsm/kg	Percentis peso/altura	Índice de massa corporal	Função pancreática	FEV ₁ /FVC**	Colonização	Score de Brasfield (RX pulmonar)	Score de Shwachman
1	100*	<P5/P10	14	PI		Ec	24	80
2	Não efectuou	P10-25/P5	19	PI		Pa / Sa	23	85
3	173	P10-25/<P5	15	PI		Sp / Sa / Hi	19	80
4	225	P75/P25-50	17	PI	68 / 78	Sa / Sp / Hi	23	95
5	225	P10-25/P25	15	PI	64 / 74	Pa / Sa / Ec/ Cand	23	85
6	>200	P5/P10	14	PI	66 / 80	Pa / Sa/ Cand	19	75
7	>200	<P5/<P5	14	PI	62 / 70	Pa / Sa / Sp / Cand	19	70
8	252	<P5/P5	16	PI	50 / 55	Pa / Sa / Kleb / Ser	17	55
9	>200	<P5/P5	16	PI	45 / 57	Pa /Hi / Sa/ Asp / Cand	13	45
10	312	<P5/P5	15	PI	34 / 41	Pa / Sa / Cand / Aci /Hi	13	35

*- mmol/L; Aci – *Acinetobacter*; Asp – *Aspergillus fumigatus*; Cand – *Candida albicans*; Ec – *Escherichia coli*; Hi – *Hemophilus influenzae*; Kleb – *Klebsiella pneumoniae*; Pa- *Pseudomonas aeruginosa*; Sa – *Staphylococcus aureus*; Sp – *Streptococcus pneumoniae*; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; **- % relativamente ao previsto para a idade; IP- insuficiência pancreática; M- média; dp- desvio padrão; P- percentil; Score de Shwachman: 100-86= Excelente (E); 85-71= Bom (B); 70-56= Razoável (R); 55-41= Moderado (M); <40= Severo (S); Score de Brasfield: pontuação total = 25 – pontos obtidos (0 a 22- quanto mais pontos maior a gravidade).

grupos de doentes ($p=0,493$).

O valor médio dos *scores* de Brasfield e de Shwachman foi superior no grupo B mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,275$ e $0,686$, respectivamente).

Foi observada uma correlação linear entre a idade dos doentes (grupos A e B) e os *scores* de gravidade, representada nas Figs. 1 e 2.

De acordo com os *scores* de gravidade utilizados, os fenótipos mais graves são os dos doentes 8, 9 e 10 (Quadro V). Todos são homozigóticos F508del, têm idade média de $22,7 \pm 8,7$ anos com mediana de 25 anos (13 a 30 anos), dois são do sexo masculino e um do sexo feminino. A idade média de diagnóstico, neste subgrupo, foi de $68 \pm 48,5$ meses,

scores was seen. This is shown in figures 1 and 2.

According to the Severity scores used, the more serious phenotypes are those of patients 8, 9 and 10 (Table V). All are homozygous for the F508del mutation, with an average age of 22.7 ± 8.7 years with a median of 25 years (13 to 30 years). Two are male and one female. The average age at diagnosis in this subgroup was 68 ± 48.5 months with a median of 60 months (24 to 120 months). The average age of the first manifestations was 9 months with a median of 9 (5 to 12 months).

On the genotype of the patients (Table VI), it must be stressed that both group A and B

Table II – Clinical characterisation of group A

Patient	Sweat test (average) mOsm/Kg	Weight/Height percentiles	Body mass index	Pancreatic function	FEV ₁ /FVC**	Colonization	Brasfield score (pulmonary RX)	Shwachman score
1	100*	<P5/P10	14	PI		Ec	24	80
2	Not done	P10-25/P5	19	PI		Pa / Sa	23	85
3	173	P10-25/<P5	15	PI		Sp / Sa / Hi	19	80
4	225	P75/P25-50	17	PI	68 / 78	Sa / Sp / Hi	23	95
5	225	P10-25/P25	15	PI	64 / 74	Pa / Sa / Ec/ Cand	23	85
6	>200	P5/P10	14	PI	66 / 80	Pa / Sa/ Cand	19	75
7	>200	<P5/<P5	14	PI	62 / 70	Pa / Sa / Sp/ Cand	19	70
8	252	<P5/P5	16	PI	50 / 55	Pa / Sa / Kleb / Ser	17	55
9	>200	<P5/P5	16	PI	45 / 57	Pa / Hi / Sa/ Asp / Cand	13	45
10	312	<P5/P5	15	PI	34 / 41	Pa / Sa / Cand / Aci /Hi	13	35

*- mmol/L; Aci – *Acinetobacter*; Asp – *Aspergillus fumigatus*; Cand – *Candida albicans*; Ec – *Escherichia coli*; Hi – *Hemophilus influenzae*; Kleb – *Klebsiella pneumoniae*; Pa- *Pseudomonas aeruginosa*; Sa – *Staphylococcus aureus*; Sp – *Streptococcus pneumoniae*; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; **- % relative to that expected for that age; PI - pancreatic insufficiency; M- average; dp- deviation from pattern; P- percentile; Shwachman score: 100-86= Excellent (E); 85-71= Good (B); 70-56= Reasonable (R); 55-41= Moderate (M); <40= Severe (S); Brasfield score: total points = 25 – points obtained (0 to22- the more points, the more severe).

com mediana de 60 meses (24 a 120 meses). A idade média das primeiras manifestações foi de 9 meses, com mediana de 9 (5 a 12 meses). Relativamente ao genótipo dos doentes (Quadro VI), é de realçar que, quer no grupo A quer no grupo B, todos apresentaram mutações de classe I e II. A mutação Q1100P não foi, até à data, classificada de acordo com o nível de alteração da proteína CFTR.

Discussão

Têm sido desenvolvidos intensos esforços no sentido de correlacionar mutações específicas da FQ com o fenótipo clínico originado.^{18,32} Os estudos efectuados encontraram uma correlação clara genótipo-fenó-

showed class I and II mutations. The Q1100P mutation has not been as of yet classified in accordance with the level of change in the CFTR protein.

Discussion

Great efforts have been made to correlate specific CF mutations with the originating clinical phenotype.^{18,32} The studies which have been carried out find a clear genotype-phenotype correlation only for pancreatic function^{33,34,35} Other phenotypical differences, such as the severity of pulmonary involvement, the time the diagnosis was made and the weight and height percentiles are not so clear to correlate with the geno-

Quadro III – Caracterização clínica do grupo B

Doente	Idade (anos)	sexo	Genótipo	Idade das 1 ^{as} manifestações (meses)	Idade de dx (meses)	Manifestação inicial	Outras manifestações
11	0,25	F	N1303K/N1303K	RN	RN	Íleo meconial	Tripsina Imuno-reactiva =173 µg/ml-
12	1	F	F508del/Q1100P	2	8	Tosse persistente / SDR grave	Citólise hepática
13	2	F	F508del/Q1100P	12	18	Irmã falecida com FQ Infecções respiratórias	Tripsina Imunoreactiva = 371 µg/ml
14	2	F	F508del/R1162X	1	2	Tosse persistente / má progressão EP	-
15	2	F	F508del/A561E	18	23	Infecções respiratórias/ /má progressão EP	Polipose nasal
16	9	M	F508del/Y1092X	8	12	Infecções respiratórias / /esteatorreia	Polipose nasal
17	15	M	F508del/G542X	12	144	Diarreia frequente	Citólise hepática
18	18	F	F508del/2184delA	7	84	Infecções respiratórias	-

Citólise hepática - elevação assintomática das transaminases séricas; F – feminino; M – masculino; RN – recém-nascido; Tripsina imuno-reactiva – normal: < 70 µg/ml

tipo apenas para a função pancreática.^{33,34,35} Outras diferenças fenotípicas, como a gravidade do envolvimento pulmonar, a idade do diagnóstico e os percentis de peso e altura, não são tão claramente correlacionáveis com o genótipo, o que sugere que estes fenótipos podem ser “modulados” por factores genéticos adicionais e ambientais.³⁶ A avaliação de grandes amostras de doentes homocigóticos para uma determinada mutação é crucial na avaliação da correlação genótipo-fenótipo. Na ausência de homocigóticos, os heterocigóticos compostos para uma mutação bem caracterizada, como a F508del e uma outra mutação específica em estudo, poderão ser examinados em comparação com homocigóticos F508del do mesmo sexo e idade, tratados no mesmo centro.² As variações

type. This suggests that these phenotypes can be modulated by additional genetic and environmental factors.³⁶ The evaluation of the large samples of patients homozygous for a specific mutation is crucial in the evaluation of the genotype-phenotype correlation. In the absence of homozygous patients, the patients who are heterozygous composite for such a well characterised mutation as the F508del and another specific mutation under study could be examined in comparison with patients homozygous for the F508del mutation who are of the same sex and age treated in the same centre.² The various genotypes detected in our population lead us to believe we will find specific characteristics in out-patients which, despite the small scale of our sample, leads us to a clinical approach

Table III – Clinical characterisation of group B

Patient	Age (years)	sex	Genotype	Age at the first manifestations (months)	Age of dx (months)	Initial manifestation	Other manifestations
11	0.25	F	N1303K/N1303K	NB	NB	Ilium meconium	Tripsina Imunoreactiva = 173 µg/ml-
12	1	F	F508del/Q1100P	2	8	Persistent cough / severe SDR	Hepatic cytolysis
13	2	F	F508del/Q1100P	12	18	Sister died of CF/ Respiratory infections	Tripsina Imunoreactiva = 371 µg/ml
14	2	F	F508del/R1162X	1	2	Persistent cough / under progressing EP	-
15	2	F	F508del/A561E	18	23	Respiratory infections / under progressing EP	Nasal polyps
16	9	M	F508del/Y1092X	8	12	Respiratory infections / steatorrhoea	Nasal polyps
17	15	M	F508del/G542X	12	144	Frequent diarrhoea	Hepatic cytolysis
18	18	F	F508del/2184delA	7	84	Respiratory infections	-

Hepatic cytolysis - asymptomatic elevation of the serum transaminases; F – female M – male; NB – new-born; Immunoreactive trypsin – normal: < 70 µg/ml

genotípicas detectadas na nossa população levam-nos a esperar encontrar características específicas nos nossos doentes, razão pela qual, apesar da pequena dimensão da amostra, se procurou fazer uma abordagem da clínica em correlação com o genótipo dos doentes. Na série de doentes apresentada, 10 (56 %) são homozigóticos F508del, 7 (39 %) heterozigóticos (F508del/outra mutação) e 1 doente é homozigótico N1303K. A proporção de doentes homozigóticos F508del é, pois, aproximadamente a da população geral no nosso país.³⁷ De referir que, com excepção das mutações N1303K, G542X, todas as outras encontradas nos heterozigóticos têm frequência inferior a 1% nas populações estudadas, a nível da Europa.⁸ Curiosamente, a mutação Q1100P foi detec-

in correlation with the genotype of the patients. In the series of patients presented, 10 (56%) are homozygous for the F508del mutation 7 (39%) are heterozygous for the F508del/other mutation and 1 patient is N1303K homozygous. The proportion of the patients homozygous for the F508del mutation approximates to the general population of Portugal.³⁷ It is to be pointed out that, with the exception of the N1303K and G542X mutations, all the other mutations founding the heterozygous patients are less than 1% in the populations studied at European level.⁸

Curiously, the Q1100P mutation was detected in two patients although there was only a small sample of patients and a small rate of frequency, according to the published

Quadro IV – Caracterização clínica do grupo B

Doente	Prova de suor (média) Meq/L	Percentis peso/altura	Índice de massa corporal	Função pancreática	FEV ₁ /FVC**	Colonização	Score de Brasfield (RX pulmonar)	Score de Shwachman
11	Não efectuou	<P5/P5-10	12	PI			24	80
12	251	P10-25/ P25-50	16	PI		Sa / Bc	24	75
13	91*	P25-50/ P5-10	17	PI			23	85
14	100*	P5/P5	15	PI		Sa / Bc / Hi / Cand / Ser / Kleb	23	75
15	219	<P5/P25	13	PI		Hi / Ec / Cand	23	80
16	>200	P75/P75	18	PI	53/54	Pa / Sa / Asp / Sp / Hi	16	65
17	281	P50/P50	20	PI	62 / 64	Pa / Sa / Sten M / Cand	22	90
18	270	P50-75/ P25-50	22	PI	70/81	Pa / Prot / Sp	17	70

*- mmol/L; Asp – *Aspergillus fumigatus*; Bc – *Burkholderia cepacia*; Cand – *Candida albicans*; Ec – *Escherichia coli*; Hi – *Hemophilus influenzae*; Kleb – *Klebsiella pneumoniae*; Pa- *Pseudomonas aeruginosa*; Prot – *Proteus*; Ser – *Serratia*; Sa – *Staphylococcus aureus*; Sten M – *Stenotrophomonas maltophilia*; Sp – *Streptococcus pneumoniae*; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; **- % relativamente ao previsto para a idade; IP- insuficiência pancreática; M- média; dp- desvio padrão; P- percentil; Score de Shwachman: 100-86= Excelente (E); 85-71= Bom (B); 70-56= Razoável (R); 55-41= Moderado (M); <40= Severo (S); Score de Brasfield: pontuação total = 25 – pontos obtidos (0 a 22: quanto mais pontos maior a gravidade).

tada em dois doentes, apesar de se tratar de uma amostra pequena de doentes e da pequena frequência desta mutação, de acordo com a literatura.^{1,8}

Todas as mutações encontradas neste grupo de doentes são mutações associadas a fenótipo grave (classe I ou II). A mutação Q1100P não foi ainda classificada do ponto de vista funcional (Quadro VI).

A idade de diagnóstico variou desde o período neonatal até aos 12 anos. O diagnóstico foi feito no primeiro ano de vida em 50% dos casos e em 83% dos doentes a doença foi detectada nos primeiros cinco anos. Os dois doentes em que o diagnóstico foi feito no

literature.^{1,8}

All the mutations found in this group of patients are mutations associated with a severe phenotype (class I or II). The Q1100P mutation has not yet been classified from a functional point of view (Table VI).

The time of diagnosis varies between the neonatal period and 12 years of age. The diagnosis was made in the first years of life in 50% of the cases and in 83% of the patients the disease was detected in the first five years. The two patients in whom the diagnosis was made in the neonatal period showed signs in the ileum meconium, which allowed for an earlier diagnosis.

Table IV – Clinical characterisation of group B

Patient	Sweat test(average) Meq/L	Weight/height percentiles	Body mass index	Pancreatic function	FEV ₁ /FVC**	Colonisation	Brasfield score(Pulmonary RX)	Shwachman score
11	Not done	<P5/P5-10	12	PI			24	80
12	251	P10-25/ P25-50	16	PI		Sa / Bc	24	75
13	91*	P25-50/ P5-10	17	PI			23	85
14	100*	P5/P5	15	PI		Sa / Bc / Hi / Cand / Ser / Kleb	23	75
15	219	<P5/P25	13	PI		Hi /Ec / Cand	23	80
16	>200	P75/P75	18	PI	53/54	Pa / Sa / Asp / Sp / Hi	16	65
17	281	P50/P50	20	PI	62 / 64	Pa / Sa / Sten M / Cand	22	90
18	270	P50-75/ P25-50	22	PI	70/81	Pa / Prot / Sp	17	70

*- mmol/L; Asp – *Aspergillus fumigatus*; Bc – *Burkholderia cepacia*; Cand – *Candida albicans*; Ec – *Escherichia coli*; Hi – *Hemophilus influenzae*; Kleb – *Klebsiella pneumoniae*; Pa- *Pseudomonas aeruginosa*; Prot – *Proteus*; Ser – *Serratia*; Sa – *Staphylococcus aureus*; Sten M – *Stenotrophomonas maltophilia*; Sp – *Streptococcus pneumoniae*; FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; **- % relevant to that expected for that age; PI- pancreatic insufficiency; M- average; dp- deviation from pattern; P- percentile; Shwachman score: 100-86= Excellent (E); 85-71= Good (G); 70-56= Reasonable (R); 55-41= Moderate (M); <40= Severe (S); Brasfield score: total points = 25 – points obtained (0 a 22: the more points, the more severe).

período neonatal apresentaram quadro de íleo meconial, o que permitiu o diagnóstico mais precoce.

A idade média de apresentação da doença e de diagnóstico foi inferior nos doentes homozigóticos F508del, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,831$ e $0,873$, respectivamente). De referir que este diagnóstico continua a ser tardio, comparativamente à idade média de diagnóstico nos EUA, que, de acordo com os dados da Fundação da Fibrose Quística, era de 6 meses no ano de 2002.³⁸ No caso em que mediou um maior intervalo entre as primeiras manifestações de doença e o diagnóstico (doente

The average age of presentation of the disease and the diagnosis was less in patients homozygous for the F508del mutation, but the difference was not statistically significant ($p=0.831$ and 0.873 respectively). It should be pointed out that the diagnosis continues to be made late, in comparison with the average age of diagnosis in the USA, which, according to the data of the Cystic Fibrosis Foundation was at 6 months in 2002.³⁸ As to the case in which the greatest interval between the first signs of the disease and the diagnosis was made (patient 17), the absence of initial signs of pulmonary disease area will probably have contributed to the delayed

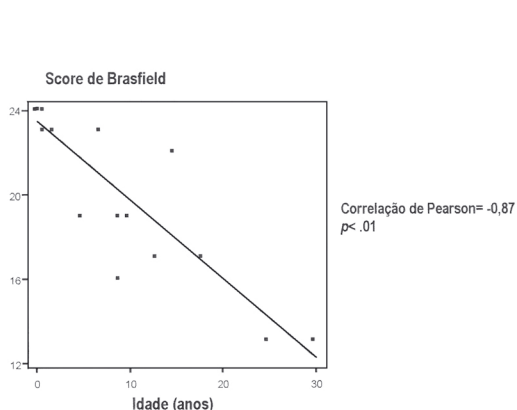


Fig. 1 – Pontuação no score de Brasfield versus idade do doente.

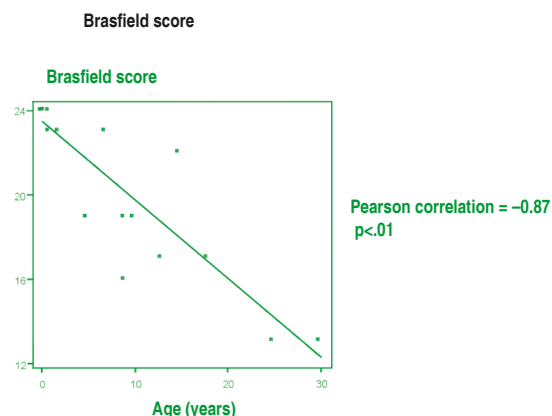


Fig. 1 – Brasfield score points versus age of patient.

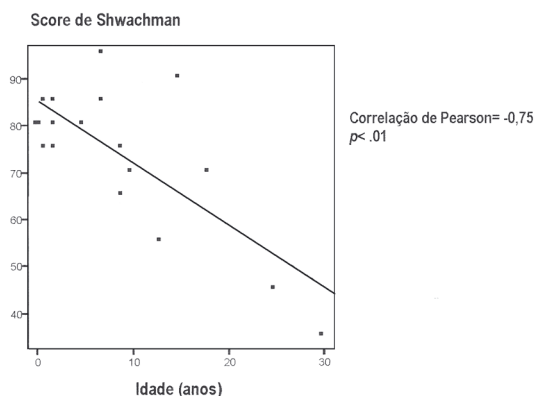


Fig. 2 – Pontuação no score de Shwachman versus idade do doente.



Fig. 2 – Shwachman score points versus age of patient.

17), a ausência de manifestações iniciais do foro respiratório terá, provavelmente, contribuído para o atraso do diagnóstico.

Uma das crianças foi rastreada na sequência do diagnóstico na irmã, homozigótica F508del.

Neste grupo de doentes não foi encontrada nenhuma prova de suor negativa nem no limiar da normalidade. Em dois doentes não foi efectuada prova de suor, uma vez que, perante a clínica sugestiva (num dos casos, íleo meconial) e o valor aumentado de trip-

diagnosis.

One of the children was identified following the diagnosis of his sister who was found to be homozygous for F508del mutation. There was no negative sweat proficiency analysis test or one bordering normality found in this group of patients. The sweat proficiency analysis test was not performed in two patients as, following a suggestive clinical picture (in one of the cases, ileum meconium) and the higher level of immunoreactive trypsin, CF mutation research was

sina imunorreactiva, foi efectuada a pesquisa de mutações FQ, que permitiu o diagnóstico. O valor da prova de suor foi sobreponível nos dois grupos de doentes, embora a comparação de grandezas seja dificultada pelo facto de alguns laboratórios apresentarem o resultado da prova como > 200 . Dado o valor decisivo que a prova de suor continua a apresentar no diagnóstico da FQ, é importante que a sua realização obedeça às recomendações da Fundação Americana da Fibrose Quística.³⁹

De acordo com a Fundação da Fibrose Quística (Registo Anual de Doentes, 2002), 3,4 % dos doentes com pólipos nasais requereram intervenção cirúrgica nos EUA.³⁸ Nesta amostra de doentes, dois (11 %) foram submetidos a remoção cirúrgica de pólipos nasais (doentes 4 e 10).

Kubesh e col sugeriram que a colonização das vias respiratórias pela *Pseudomonas aeruginosa* apresentará correlação com o genótipo CFTR.⁴⁰ Há algumas evidências que sugerem que os indivíduos homozigóticos F508del ou heterozigóticos compostos F508del/mutações *nonsense* são mais susceptíveis para a colonização precoce por *Pseudomonas aeruginosa*.⁴¹ A colonização por *Pseudomonas aeruginosa* encontrou-se nos doentes homozigóticos e nos heterozigóticos, com predominio nos primeiros (70 % *versus* 38 %) mas, de facto, no grupo B os únicos doentes colonizados por *Pseudomonas aeruginosa* foram os heterozigóticos F508del/mutações *nonsense*. A idade média precoce da primeira infecção por pseudomonas foi considerada como factor de gravidade fenotípica por Duarte e col. num estudo efectuado em Portugal.⁴² Nesse estudo, tal como neste grupo de doentes, foi encontrada uma idade mais precoce da primeira infecção por *Pseudomonas aeruginosa*

carried out. This allowed the diagnosis to be made.

The value of the sweat proficiency analysis test was similar in the two groups of patients, although comparing higher values was difficult as some laboratories show the results of a test as > 200 . Given the decisive value the sweat proficiency analysis test continues to have in the diagnosis of CF, it is important that carrying it out follows the recommendations of the American Cystic Fibrosis Foundation.³⁹

According to the Cystic Fibrosis Foundation (Annual Patient Register 2002), 3.4 % of the patients with nasal polyps require surgery, in the USA.³⁸ In this sample of patients, two (11%) had surgical removal of the nasal polyps (patients 4 and 10).

Kubesh et al suggest that the colonisation of the respiratory tracts by *Pseudomonas aeruginosa* show correlation with the CFTR genotype.⁴⁰ There is some evidence to suggest that some F508del homozygous individuals or *nonsense* F508del/mutations heterozygous composite are more susceptible to early colonisation by *Pseudomonas aeruginosa*.⁴¹ The colonisation by *Pseudomonas aeruginosa* is found in homozygous patients and in the heterozygous patients with predominance in the first (70% versus 38%). In group B, however, the only patients colonised by *Pseudomonas aeruginosa* were those heterozygous for the *nonsense* F508del/mutations. The average early age of the first infection by *Pseudomonas* was considered as a severe genotype factor by Duarte et al in a study carried out in Portugal.⁴² In this study, as in this group of patients, the first infection by *Pseudomonas aeruginosa* was found at an earlier age in the patients homozygous for the F508del mutation than in the heterozygous

A colonização das vias respiratórias pela *Pseudomonas aeruginosa* apresentará correlação com o genótipo CFTR

Quadro V – Caracterização clínica dos doentes com fenótipo mais grave

Doente	Idade (anos)	Sexo	Genótipo	Idade de diagnóstico (meses)	Prova de suor (média) mOsm/kg	Percentis peso/altura	Função pancreática	FEV ₁ /FVC*	Score de Brasfield (RX pulmonar)	Score de Shwachman
8	13	M	F508del/F508del	60	252	<P5/P5	PI	50 / 55	17	55
9	25	M	F508del/F508del	24	>200	<P5/P5	PI	45 / 57	13	45
10	30	F	F508del/F508del	120	312	<P5/P5	PI	34 / 41	13	35

FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; * - % relativamente ao previsto para a idade; M- média; dp- desvio padrão.

Table V – Clinical characterisation of patients with a more severe phenotype

Patient	Age (years)	Sex	Genotype	Age at diagnosis (months)	Sweat test (average) mOsm/Kg	Weight/height percentiles	Pancreatic function	FEV ₁ /FVC*	Brasfield score (pulmonary RX)	Shwachman score
8	13	M	F508del/F508del	60	252	<P5/P5	PI	50 / 55	17	55
9	25	M	F508del/F508del	24	>200	<P5/P5	PI	45 / 57	13	45
10	30	F	F508del/F508del	120	312	<P5/P5	PI	34 / 41	13	35

FEV₁ – forced expiratory volume in 1 second; FVC – forced vital capacity; * - % relevant to that expected for that age; M- average; dp- deviation from pattern.

Quadro VI – Classificação das mutações encontradas

Mutação	Classe
F508del	II
N1303K	II
Q1100P	*
R1162X	II
A561E	II
Y1092X	I
G542X	I
2184delA	I

Mutações Classe I: mutações *nonsense*; Mutações Classe II: mutações *missense*; * - mutação não classificada

Table VI – Classification of the mutations found

Mutation	Class
F508del	II
N1303K	II
Q1100P	*
R1162X	II
A561E	II
Y1092X	I
G542X	I
2184delA	I

Mutations Class I: *nonsense* mutations; Mutations Class II: *missense* mutations; * - non classified mutation

nos homozigóticos F508del do que nos heterozigóticos. No futuro, a aplicação de uma vacina anti-pseudomonas, já em fase de aplicação clínica em vários centros, e brevemente também no nosso, poderá melhorar o prognóstico destes doentes.

No que se refere ao prognóstico, doentes com insuficiência pancreática têm predisposição para formas mais graves de doença indicado pela idade precoce do diagnóstico, maior gravidade de doença pulmonar, menores percentis para o peso e a altura e, provavelmente, níveis mais elevados de cloreto no suor do que os encontrados em doentes com suficiência pancreática.³² Neste estudo, todos os doentes apresentam insuficiência pancreática com base na clínica e nos valores de quimiotripsina fecal e/ou elastase fecal, o que poderá explicar a homogeneidade fenotípica observada.

Estudos anteriores efectuados em Portugal constatarem uma apresentação clínica dos doentes com a mutação A561E sobreponível à dos doentes homozigóticos F508del, mas com doença pulmonar de menor gravidade (Barreto C e Rocha H, comunicação livre).²² No nosso caso (doente 15), dada a pequena evolução da doença, é difícil antever a gravidade da doença pulmonar.

A apresentação da doença na forma de íleo meconial, apesar de permitir um diagnóstico mais precoce e como tal antecipar o início do tratamento, tem-se associado a pior prognóstico em termos de sobrevida e doença pulmonar.^{43,44} No entanto, nesta amostra de doentes não se verificou maior gravidade da doença nos doentes 5 e 11, com esta forma de apresentação.

Como seria de esperar, dada a gravidade dos genótipos, não se encontram nesta amostra diferenças evidentes entre o genótipo (Grupo

ones. In the future, the use of an anti-pseudomonas vaccine, already in the clinical application phase in several centres, and soon in Portuguese ones, could improve the prognosis of these patients.

In prognostic terms, patients with pancreatic insufficiency have a predisposition for more severe forms of disease indicated by the early age of diagnosis, more severe pulmonary disease, lower weight and height percentiles and probably higher levels of chloride in the sweat than those found in pancreatic sufficient patients.³² In this study, all the patients present clinical pancreatic insufficiency, based on the values of the faecal chymotrypsin and/or faecal elastase. This could explain the phenotypical homogeneity seen.

In previous studies carried out in Portugal there is a clinical presentation of the patients with the A561E mutation, similar to that of the patients homozygous for the F508del mutation but with less serious pulmonary disease (Barreto C e Rocha H, private communication).²² In our case (patient 15), it is difficult to foresee the severity of the pulmonary disease due to the slight evolution of the disease.

The presentation of the disease in the form of ileum meconium allows for an earlier diagnosis which means treatment can be started earlier. It is, however, associated with a worse prognosis in terms of survival and pulmonary disease.^{43,44} In this small sample of patients, however, a severity of the disease was not seen in patients 5 and 11 with this form of presentation.

As might be expected given the severity of the genotypes, there were no evident differences found in this sample between the genotype (Group A and B) and the ponderal

A apresentação da doença na forma de íleo meconial (...) tem-se associado a pior prognóstico em termos de sobrevida e doença pulmonar

A e B) e a evolução estaturó-ponderal ou a gravidade da doença pulmonar. Não foram realizadas provas funcionais respiratórias nos doentes de menor idade, pela dificuldade de colaboração na sua execução.

Como seria de prever, foi encontrada correlação linear entre a idade e os *scores* de gravidade clínica e radiológica.

Os dois doentes com menor *score* de Shwachman (doentes 9 e 10) são aqueles com maior evolução da doença (25 e 30 anos de idade), sendo nos restantes impossível estabelecer uma relação linear entre o genótipo e a gravidade fenotípica. Para além destes, um outro doente foi considerado como “fenótipo geral severo”. Os três são homozigóticos para a mutação F508del e são os três doentes mais velhos dentro deste grupo.

No entanto, é de realçar que o doente 17, que apresenta duas mutações de classe I (grave), apresenta *score* de Shwachman de 90. Esta observação reforça a noção de que a gravidade clínica não depende apenas do genótipo do doente, pelo que se pode falar num espectro de manifestações clínicas para um mesmo genótipo. De facto, nesta amostra de doentes é verdade que os casos com fenótipo mais severo são doentes homozigóticos F508del, mas é igualmente evidente que, com este mesmo genótipo, encontramos doentes com fenótipo leve. Neste grupo encontra-se o doente com maior *score* de Shwachman⁹⁵.

Provavelmente, a homogeneidade de fenótipos entre homozigóticos e heterozigóticos estará relacionada com a coexistência de duas mutações graves em ambos os grupos. Estes resultados são sobreponíveis aos encontrados num estudo alargado envolvendo doentes com FQ de 14 países, em que se verificou semelhança de gravidade clínica

state evolution or the severity of the pulmonary disease. Functional respiratory tests were not carried out in the patients who are minors, in view of the difficulties inherent in performing them.

As was to be expected, a linear correlation was found between the age and the clinical severity and radiological scores.

The two patient with the lower Shwachman scores (patients 9 and 10) are those with the greatest evolution of the disease (25 and 30 years of age), it being impossible in the rest to establish a linear relation between the patient's genotype and the phenotype severity. In addition to these, another patient was considered as a general severe phenotype. The three patients homozygous for the F508del mutation are the three eldest patients of the group.

It should be stressed, however, that patient 17, who presented two class I mutations (severe) had a Shwachman score of 90. This observation reinforced the notion that the clinical severity does not depend solely on the patient's genotype, in that we can speak of a spectrum of clinical manifestations for the same genotype. In fact, in this sample of patients it is true that the cases with a more severe phenotype are patients homozygous for the F508del mutation, but it is equally evident that patients are found with this same genotype with light phenotype. In this group was the patient with the highest Shwachman score (95).

The homogeneity of phenotypes between homozygous and heterozygous patients is probably connected to the coexistence of severe mutations in both groups. These results are similar to those found in larger studies involving CF patients from 14 countries in which similar clinical severity between patients ho-

A gravidade clínica não depende apenas do genótipo do doente

entre homozigóticos F508del e heterozigóticos com a mutação F508del e outra mutação, com excepção dos heterozigóticos F508del/R117H (fenótipo menos grave).³⁶

Limitações do trabalho

- A amostra de doentes neste trabalho é pequena, o que se justifica pelo facto de um dos critérios de inclusão ser o conhecimento prévio das duas mutações FQ existentes e não simplesmente o diagnóstico de FQ, e pela necessidade de obtenção de consentimento informado por parte do próprio ou de um adulto responsável para a participação num estudo mais abrangente que incluía colheitas de material biológico. Desta forma, muitas das observações não têm significado estatístico e deverão sobretudo constituir o ponto de partida para estudos mais abrangentes, idealmente numa perspectiva nacional.
- A caracterização clínica dos doentes é feita com base numa avaliação clínica actual, mas também por consulta de informações constantes do processo de consulta, com todas as limitações inerentes, uma vez que pode ocorrer ausência de registos relativos a informações relevantes.

Conclusões

Dada a quase inexistência de trabalhos descritivos baseados na população de doentes portugueses com FQ, este trabalho teve como objectivo caracterizar uma população de doentes com duas mutações FQ identificadas, em seguimento num dos maiores centros hospitalares do nosso país.

Tal como sobejamente descrito, as mutações de classes I e II, em homozigotia, dão lugar a um fenótipo mais grave com insuficiência

mozygous for the F508del and F508del mutation and patients who are heterozygous for other mutations, with the exception of patients heterozygous for the F508del/R117H (more severe phenotype) mutation.³⁶

Limits to the study

- The sample of patients in this study is small. This is justified by the fact that one of the inclusion criteria was the prior recognition of two existing CF mutations and not simply the diagnosis of CF and by the need to obtain informed consent from the patients themselves or a responsible adult to take part in a more wide-ranging study involving the collecting of biological samples. In this way, many of the observations did not have statistical significance and should above all constitute a point of departure for more wide-ranging studies, ideally with a national focus.
- The clinical characterisation of the patients is made on the basis of current clinical evaluation, but also by consulting information gleaned from the clinical file, with all the inherent limits, seeing as there could be some gaps in the relevant information registered.

Conclusions

Given the almost non-existence of descriptive studies based on populations of Portuguese CF patients, this study aimed to characterise a population of patients with two identified CF mutations who were being monitored at one of Portugal's largest hospitals.

As described above, the class I and II mutations in homozygous patients gave rise to a more severe phenotype with pancreatic insuf-

As mutações de classes I e II, em homozigotia, dão lugar a um fenótipo mais grave

Doentes com o mesmo genótipo (...) apresentaram diferentes espectros de manifestações clínicas e de gravidade fenotípica

pancreática. A correlação do genótipo com a doença pulmonar e outras manifestações da doença tem sido mais difícil de estabelecer e parece ser muito menos linear. Desta forma, todos os doentes desta amostra apresentaram um fenótipo de insuficiência pancreática e maior variabilidade de manifestações pulmonares. Não se encontraram variações significativas em termos de idade de diagnóstico, formas de apresentação e gravidade da doença entre doentes homozigóticos F508del e restantes doentes, dada a homogeneidade das mutações encontradas. Em contrapartida, doentes com o mesmo genótipo (homozigóticos F508del) apresentaram diferentes espectros de manifestações clínicas e de gravidade fenotípica. Esta observação reforça a noção de que a gravidade clínica não depende apenas do tipo de mutações encontradas, pelo que se pode falar num espectro de manifestações clínicas para um mesmo genótipo. Tanto ou mais do que a caracterização genotípica, o tempo de evolução da doença e os factores externos (nomeadamente a sujeição a estímulos infecciosos) deverão interferir na gravidade do fenótipo, num dado momento.

O diagnóstico de FQ, entre nós, continua a ser tardio

De acordo com esta amostra de doentes, conclui-se que o diagnóstico de FQ, entre nós, continua a ser tardio, apesar da informação cada vez mais generalizada sobre a doença. É importante realçar a importância das campanhas educativas no seio da classe médica e na comunidade em geral, que deverão ter como ponto de partida os centros de referência no diagnóstico e tratamento desta doença, como é o caso do nosso hospital.

iciency. The correlation of the genotype with pulmonary and other signs of the disease have made it more difficult to establish and it seems to be considerably less linear. Accordingly, all the patients in this sample present a pancreatic insufficiency phenotype and a greater variability of pulmonary signs. Significant variations in terms of time of diagnosis, forms of presentation and severity of the disease were not found between patients homozygous for the F508del mutation and the rest of the patients, given the homogeneity of the mutations found. On the other hand, patients with the same genotype (homozygous for the F508del mutation) showed different spectra of the clinical signs and the severity of the phenotype. This observation reinforces the notion that the clinical severity does not depend solely on the type of mutations found, in that we can talk about a spectrum of clinical signs for the same genotype. Equal to or even more so than the genotype characterisation, the time period of the evolution of the disease and the external factors (more specifically subjection to infectious stimuli) interferes in the severity of the genotype at a given time.

According to this sample of patients, it can be concluded that the diagnosis of CF in Portugal continues to be dilatorily, in spite of information about the disease becoming increasingly more widespread. It is important to underline the importance of educational campaigns among the medical and lay community whose departure point should be the centres well known for the diagnosis and treatment of this disease, as is the case of our hospital.

Correspondência

Micaela Guardiano
 Departamento de Pediatria – Hospital de S. João
 Email: mguardiano@hotmail.com
 Tel.: 918721448

Correspondence to

Ms Micaela Guardiano
 Departamento de Pediatria – Hospital de S. João
 Email: mguardiano@hotmail.com
 Tel.: 918721448

Bibliografia/Bibliography

1. Bienvenu T. La mucoviscidose: les relations entre le génotype et le phénotype. *Arch Pediatr* 2003; 10 (Suppl 2) : 318-324.
2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Tsui LC. Identification of the Cystic Fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-1065.
3. Riordan JR, Rommens M, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Drumm ML, Iannuzzi MC, Tsui LC et al. Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
4. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Tsui LC et al. Identification of the Cystic Fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
5. Ellsworth RE, Jamison DC, Touchman JW, Chisoe SL, Braden MV, Bouffard GG et al. Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1172-1177.
6. Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 609-630.
7. Tsui LC, Durie P. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Hosp Pract* 1997; 15: 128-134.
8. Estivill X, Bancells C, Ramos C and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium. Geographic Distribution and Regional Origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations. *Hum Mutat* 1997; 10: 135-154.
9. Welch MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-1254.
10. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In "The molecular and metabolic basis of inherited disease." CL Scriver, AL Beaudet, WS Sly and D Valle, Eds; 2001; 5121-5188, Mc Graw-Hill, New York.
11. Becq F. CFTR et les anomalies des transports ioniques dans la mucoviscidose. *Arch Ped* 2003; 10, Suppl 2 : 325-332.
12. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Use of protein repair

- therapy in the treatment of cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr* 1998; 10: 250-255.
13. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in Cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003; 361: 1671-1676.
14. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis. *Med Clin North Am* 2000; 84(3): 597-607.
15. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levinson H et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: analysis of the most common mutation (F508del). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517-1522.
16. Ferrari M, Colombo C, Sebastio G. Cystic fibrosis patients with liver disease are not genetically distinct. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 815-816.
17. Hamdi I, Payne SJ, Barton DE, McMahon R, Green M, Shneerson JM et al. Genotype analysis in cystic fibrosis in relation to the occurrence of diabetes mellitus. *Clin Genet* 1993; 43: 186-189.
18. Ferrari M, Cremonesi L. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients. *Ann Biol Clin* 1996; 54(6): 235-241.
19. Kerem E, Kerem B. The relationship between genotype on phenotype in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 1995; 1(6): 450-456.
20. Moreno RMG, Bermúdez JA. El diagnóstico de la fibrosis quística en el adulto. *Arch Bronchopneum* 2000; 36 (1): 3-6.
21. Bienvenu T. Molecular basis of phenotype heterogeneity in cystic fibrosis. *Ann Biol Clin* 1997; 55(2): 113-121
22. Mendes F, Rosa MR, Dragomir A, Farinha CM, Roomans GM, Amaral MD et al. Unusually common cystic fibrosis mutation in Portugal encodes a misprocessed protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 665-671
23. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000; 67(2): 117-133.
24. Casals T, Pacheco P, Barreto C, Gimenez J, Ramos

- MD, Pereira S et al. Missense mutation R1066C in the second transmembrane domain of CFTR causes a severe cystic fibrosis phenotype: study of 19 heterozygous and 2 homozygous patients. *Human Mutation* 1997; 10(5): 387-392.
25. Beck S, Penque D, Garcia S, Gomes A, Farinha C, Mata L et al. Cystic Fibrosis patients with the 3272-26A→G mutation have mild disease, leaky alternative mRNA splicing and CFTR protein at the cell membrane. *Human Mutation* 1999; 14(2): 133-144.
26. Amaral MD, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P et al. Cystic Fibrosis patients with the 3272-26A→G mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001; 38(11): 777-783.
27. Pacheco P. Portugal in detection rate of CF causing CFTR mutations in different countries of the world in the molecular genetic epidemiology of Cystic Fibrosis. WHO report 2004. (www.who.int/genomics/publications/en/)
28. Pereira L, Bandeira T, Amaral M, Barreto C. Aumento da esperança média de vida nos doentes com Fibrose Quística: experiência do Centro de Fibrose Quística da Unidade de Pneumologia do Serviço de Pediatria do Hospital de Santa Maria. *Rev Port Pneumol* 1998; IV(6): 599-609.
29. Shwachman H, Kulczycki LL. Longterm study of one hundred and five patients with cystic fibrosis: studies made over a five to fourteen year period. *Am J Dis Child* 1958; 96: 6-15.
30. Brasfield D, Hicks G, Soong S, Tiller RE. The chest roentgenogram in cystic fibrosis: a new scoring system. *Pediatrics* 1979; 63: 24-29.
31. Brasfield D, Hicks G, Soong S, Peters J, Tiller R. Evaluation of scoring system of the chest radiograph in cystic fibrosis: a collaborative study. *Am J Roentgenol* 1980; 134: 1195-1198.
32. Decaestecker K, Decaestecker E, Castellani C, Jaspers M, Cuppens H, De Boeck K. Genotype/phenotype correlation of the G85E mutation in a large cohort of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2004; 23: 679-684.
33. Kerem BS, Buchanan J, Durie P, Corey M, Levison H, Rommens J et al. DNA marker haplotypes association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 827-834.
34. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29: 777-80.
35. Devoto M, De Benedetti L, Seia M, Piceni Sereni L, Ferrari M, Bonduelle ML et al. Haplotype in cystic fibrosis patients with or without pancreatic insufficiency from four European populations. *Genomics* 1989; 5: 894-898.
36. Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med* 1993; 329(18): 1308-1313.
37. Tsui LC. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: S47-S53.
38. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2002, Bethesda, Maryland.
39. Le Grys VA. Sweat analysis proficiency testing for Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30: 476-480.
40. Kubesh P, Dork T, Wulbrand U, Kalin N, Neumann T et al. Genetic determinants of airways colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Lancet* 1993; 341: 189-193.
41. Quintas S, Pereira L, Lito L, Barreto C. Perfil Epidemiológico das infecções bacterianas do aparelho respiratório em doentes com fibrose quística. *Rev Port Pneumol* 2003; IX (4): 337-352.
42. Duarte A, Barreto C, Marques-Pinto L, Tavares MC, Amil J, Pinto M et al. Cystic Fibrosis in the Portuguese population: haplotype distribution and molecular pathology. *Human Genet* 1990; 85(4): 404-405.
43. Lai HJ, Cheng Y, Cho H, Kosorok MR, Farrell PM. Association between initial disease presentation, lung disease outcomes and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 537-546.
44. Kerem E, Corey M, Kerem BS et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990; 32: 1517-1522.