

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *CFTR* EM PACIENTES
COM SUSPEITA DE FIBROSE CÍSTICA**

THAIANE RISPOLI SERRANO

Porto Alegre, março de 2016.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

THAIANE RISPOLI SERRANO

**DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE CFTR EM PACIENTES
COM SUSPEITA DE FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Porto Alegre, março de 2016.

LOCAL DE EXECUÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), tendo recebido financiamento do Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), da Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul (SES/RS), do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) e do Programa de Iniciação Científica BIC/UFRGS.

DEDICATÓRIA

Ao meu eterno pai herói, Vô Antônio!

AGRADECIMENTOS

À Deus

À minha família, minha mãe Cristina, minha tia mãe Mônica, minha vó Élide e meu irmão Uilton. Por serem o meu porto seguro. Por sempre me entenderem e me incentivarem. Pela torcida e pelo amor incondicional. Amo muito vocês.

Ao meu amor, Eduardo Argenton, por toda compreensão, incentivo e ajuda. Por participar de maneira tão importante dos meus sonhos e das minhas conquistas. Te Amo.

À minha orientadora, Dra. Maria Lúcia Rossetti, pela oportunidade e confiança. Pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e pela paciência.

À Cláudia Dornelles e Tarciana Grandi, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pela paciência.

À Simone Castro, pela oportunidade de conviver com uma profissional excepcional e pelos ensinamentos. Por sempre ouvir minhas angústias.

À comissão de acompanhamento, Dr. Augusto Schrank e Dra. Cláudia Dornelles, pela supervisão deste projeto durante estes dois anos.

Ao professor Arnaldo Zaha, por aceitar ser o revisor deste trabalho, pelas correções e pelas valiosas sugestões.

À minha amiga e parceira, Mayara Prado, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, pelas conversas, pela troca de experiências e aprendizado. Muito obrigada!

À Rúbia Medeiros e Jacqueline Valverde, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelas palavras certas e pela grande amizade construída. Por sempre estarem dispostas a explicar e resolver minhas dúvidas. Muito obrigada!

Às minhas amigas de sempre, Amandita, Cris, May e Lu pelas conversas, apoio e amizade. Obrigada pelos ótimos momentos de felicidade.

A todos os colegas e amigos do laboratório CDCT, em especial, à Karen, Laura, Karine, Cíntia, Tarci, Gabriel, Gabriela, Jéssica, Carol, pelo carinho e amizade que tornaram os dias de dedicação em dias divertidos e mais prazerosos.

À Letícia Filippon, por toda atenção e carinho. Pelos ensinamentos e pela amizade construída.

À Silvia Centeno e Luciano Saucedo, por serem sempre muito prestativos nos momentos de dúvidas.

Ao Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Hospital Materno infantil Presidente Vargas pela grande parceria.

Aos professores Arnaldo Zaha, Sabrina Matos Almeida e Leonardo Araujo Pinto por terem atendido ao pedido de serem a banca examinadora deste trabalho.

Muito obrigada!

ÍNDICE

LOCAL DE EXECUÇÃO E FONTES FINANCIADORAS	III
DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	XI
NOMENCLATURA.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. FIBROSE CÍSTICA: MARCOS HISTÓRICOS.....	1
1.2. DESCRIÇÃO DA DOENÇA	3
1.2.1. <i>Manifestações Clínicas</i>	5
1.2.1.1. Glândulas sudoríparas.....	6
1.2.1.2. Pâncreas e Trato gastrointestinal	7
1.2.1.3. Sistema Geniturinário	8
1.2.1.4. Sistema Respiratório	8
1.2.2. <i>Gene CFTR</i>	11
1.2.3. <i>Proteína CFTR</i>	12
1.2.4. <i>Mecanismos moleculares de disfunção da CFTR na FC</i>	14
1.2.4.1. Classe I: Ausência da síntese proteica	18
1.2.4.2. Classe II: Defeito no processamento da proteína	18
1.2.4.3. Classe III: Defeito na regulação do canal de Cl ⁻	19
1.2.4.4. Classe IV: Defeito na condução do canal de Cl ⁻	20
1.2.4.5. Classe V: Redução da síntese proteica	20
1.2.4.6. Classe VI: Redução da estabilidade proteica.....	21
1.2.5. <i>Correlação genótipo-fenótipo</i>	21
1.2.6. <i>Diagnóstico da FC</i>	23
1.2.6.1. Dosagem quantitativa do tripsinogênio imunorreativo.....	24
1.2.6.2. Teste do suor	25
1.2.6.3. Teste molecular	26
1.3. EXTENSÃO DE BASE ÚNICA (SNAPSHOT) PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES	27
1.4. TRATAMENTO.....	29

2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4. MANUSCRITO 1: “SNAPSHOT OF <i>CFTR</i> GENE: AN ALTERNATIVE STRATEGY TO CONFIRM CYSTIC FIBROSIS”.....	36
5. MANUSCRITO 2: “DETERMINATION OF THE F508DEL MUTATION IN DECEASED PATIENTS WHO WERE UNDER INVESTIGATION FOR CYSTIC FIBROSIS”.....	65
6. DISCUSSÃO GERAL.....	79
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	85
CURRICULUM VITÆ RESUMIDO.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Função da proteína CFTR no transporte iônico transepitelial.....	10
Figura 2. Diagrama esquemático da estrutura hipotética da proteína CFTR.	13
Figura 3. Classes das mutações de CFTR.	17
Figura 4. Esquema da reação com o kit ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de fibrose cística em diferentes países.....	4
Tabela 2. Classes de mutações CFTR e possíveis intervenções terapêuticas personalizadas.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
%	Por cento
°C	Graus Célsius
FC	Fibrose cística
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (Regulador da condutância transmembranar da fibrose cística)
CFTR-RD	<i>CFTR-related disorders</i> (desordens relacionadas a CFTR)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ACMG	<i>American College of Mendelian Genetics</i>
SNaPshot	<i>Single Nucleotide Primer Extension</i>
IRT	<i>Immunoreactive trypsinogen</i> (tripsinogênio imunorreativo)
CBAVD	<i>Congenital bilateral aplasia of the vas deferens</i> (Ausência bilateral congênita dos vasos deferentes)
ASL	<i>Airway surface liquid</i> (Líquido da superfície das vias aéreas)
PI	<i>Pancreatic insufficiency</i> (Insuficiência pancreática)
PS	<i>Pancreatic sufficiency</i> (Suficiência pancreática)
MSD	<i>Membrane spanning domains</i> (Domínios transmembranares)
NBD	<i>Nucleotide binding domains</i> (Domínios de Ligação de nucleotídeos)
g	Grama
K⁺	Íon potássio
Cl⁻	Íon cloreto
Na⁺	Íon sódio

HCO₃	Bicarbonato
mg	Miligramo
Kb	Quilobase
pb	Par de base
mg/mL	Miligramo por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mV	Milivolts
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína quinase C)
PKA	<i>Protein Kinase A</i> (Proteína quinase A)
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (adenosina monofosfato cíclico)
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (Guanosina monofosfato cíclico)

NOMENCLATURA

A nomenclatura adotada para as mutações no gene *CFTR*, neste trabalho, foi baseada nas recomendações da *Cystic Fibrosis Mutation Database* – CFMDB (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva de alta incidência em populações euro-descendentes (1: 2500 nascimentos) causada por mutações no gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Aproximadamente 2.000 mutações foram descritas, sendo a mais prevalente F508del. Estas mutações causam disfunções na proteína CFTR que regula as passagens de cloro e de sódio através da membrana celular, conduzindo a diferentes graus de manifestações clínicas. Atualmente, no Rio Grande do Sul (RS), apenas o estudo molecular para a mutação F508del é realizada. Portanto, é necessário a busca por métodos moleculares que possibilitem a detecção de outras mutações. O objetivo principal desse estudo foi implementar uma metodologia molecular para a detecção de 11 mutações (R1162X, G85E, R117H, 2789 + 5G>A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G>A, 3120-1G>A e G551D) no gene CFTR, utilizando a extensão de base única (SNaPshot), e aplicá-la em uma população com suspeita de FC (teste do suor alterado ou limítrofe ou com a mutação F508del detectada). O material genético foi extraído a partir de sangue total de 34 pacientes com suspeita de FC através da técnica de *salting-out*. As frequências alélicas das mutações encontradas por SNaPshot foram: G542X (5,9%), R334W (1,5%), W1282X (2,9%), 3120-1G>A (2,9%). Os genótipos encontrados, levando em consideração o complemento de informações de F508del foram: 9 (26,5%) F508del/desconhecido, 2 (5,9%) G542X / F508del, 1 (2,9%) 3120-1G>A / F508del, 1 (2,9%) R334W / F508del, 1 (2,9%) G542X / G542X, 1 (2,9%) 3120-1G>A /desconhecido, 1 (2,9%) W1282X/F508del e 1 (2,9%) W1282X/desconhecido. Adicionalmente, foi realizada a detecção da mutação F508del em pacientes com suspeita de FC que vieram a óbito durante a triagem, além da padronização de uma técnica para extração de DNA a partir de sangue seco em papel filtro S&S 903. Noventa e três pacientes com IRT maior do que 70 ng/mL foram estudados. A frequência de 2,15% destes pacientes apresentou a mutação F508del em heterozigose. Através do estudo desenvolvido foi possível padronizar um método de detecção molecular de 11 mutações no gene CFTR que,

uma vez implantado na rotina do Serviço de Referência de Triagem Neonatal, permitirá um melhor direcionamento do tratamento, aconselhamento genético, prognóstico e qualidade de vida dos pacientes.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease of high incidence in euro-descendant populations (1: 2500 live births) and is caused by mutations in the CFTR gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Approximately 2,000 mutations have been identified, F508del being the most prevalent. These mutations cause dysfunctions in the CFTR protein that regulates the passages of chloride and sodium across cell membranes, leading to different degrees of clinical manifestations. Currently, in the state of Rio Grande do Sul (RS), only the molecular study for the F508del mutation is performed. Therefore, it becomes necessary to search for molecular methods that allow the detection of other mutations. The main objective of this study was to implement a molecular methodology for the detection of 11 mutations (R1162X, G85E, R117H, 2789 + 5G> A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G> A, 3120-1G> A and G551D) in CFTR gene, using the Single-Nucleotide Primer Extension (SNaPshot), and apply the methodology in a population with CF suspicion (altered or borderline sweat test or with F508del mutation detected). The genetic material was extracted from whole blood of 34 patients with CF suspicion by salting-out technique. The allele frequencies of mutations found by SNaPshot assay were: G542X (5.9%), R334W (1.5%), W1282X (2.9%), 3120-1G>A (2.9%). The genotypes found, complementary to the information of F508del, were: 9 (26,5%) F508del/unknown, 2 (5.9%) G542X / F508del, 1 (2.9%) 3120-1G>A / F508del, 1 (2.9%) R334W / F508del, 1 (2.9%) G542X / G542X, 1 (2.9%) 3120-1G>A / unknown, 1 (2.9%) W1282X/F508del and 1 (2.9%) W1282X/ unknown. Additionally, was performed the detection of F508del mutation in patients with CF suspicion that came to death during the screening process, besides of the standardization of a technique for the extraction of DNA from dry blood fixed on filter paper S&S 903. Ninety-three patients with IRT greater than 70 ng / mL have been studied. The frequency of 2,15% of these patients presented F508del mutation in heterozygosis. Through the developed study it was possible to standardize a molecular detection method for 11 mutations in the CFTR gene that, once implanted in the routine of Newborn Screening Service Reference, will allow

better targeting of the treatment, genetic counseling, prognosis and quality of patients life.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FIBROSE CÍSTICA: MARCOS HISTÓRICOS

Em 1905, Landsteiner, pela primeira vez, fez uma descrição anátomo-patológica da Fibrose Cística (FC) em um recém-nascido falecido no quinto dia de vida por íleo meconial (Landsteiner, 1905). Dorothy Andersen, em 1938, publicou nos Estados Unidos outra descrição da FC como uma entidade patológica. Seu artigo intitulado “Fibrose cística do pâncreas e sua relação com a doença celíaca” definia a fibrose cística do pâncreas como uma desordem diferente da doença celíaca. Ela ainda formulou hipótese da etiologia da doença e propôs normatização do seu tratamento (Andersen, 1938). Nos anos de 1940, os médicos compreenderam que os sistemas de ductos e outros transportes nos órgãos afetados pela FC eram obstruídos com secreções espessas e viscosas, quando então a doença foi denominada mucoviscidose por Farber em 1945 (Wine & Joo, 2004).

Quase uma década depois foi feita a conexão entre o transporte do sal e a FC, quando em 1951 Kessler e Andersen observaram que crianças admitidas no hospital da Universidade de Columbia sofriam de prostração no calor, com sintomas de vômitos e sinais de choque sem evidencia de infecção e que respondiam rapidamente a reidratação. Achados laboratoriais, nas análises de eletrólitos, mostraram concentrações baixas de cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-). Estes achados levaram a hipótese de que a etiologia estava associada a anormalidades nas glândulas epiteliais (Kreindler, 2010). Baseado nessas observações Paul

Sant'Agnese, também da Universidade de Columbia, fez um estudo prospectivo do nível de eletrólitos em pacientes fibrocísticos e em controles sadios, demonstrando que os íons de Cl^- , Na^+ e K^+ tinham uma concentração significativamente maior no suor dos pacientes fibrocísticos. Estes achados levaram Gibson & Cooke 1959 a desenvolver o teste de suor como um teste de diagnóstico da fibrose cística considerado até hoje como teste padrão ouro da FC.

No Brasil, a primeira publicação sobre FC foi de autoria de Gesteira que, em 1949, revisou os conhecimentos sobre a doença e seus métodos diagnósticos. Ressaltou sua existência em nosso meio e chamou atenção para a ausência de publicações até aquela data (Gesteira, 1949). Nas décadas seguintes, foram extensas as publicações sobre o tema na literatura, porém, só nos anos 80 novos conhecimentos trouxeram contribuição para a compreensão da FC quando as pesquisas voltaram seu interesse para a procura do gene afetado.

Em 1981, Knowles *et al.* documentaram que indivíduos fibrocísticos, durante estresse, apresentavam absorção excessiva de sódio do lúmen aéreo para as células epiteliais e vasos sanguíneos adjacentes, acarretando, assim, níveis de água precariamente reduzidos nos pulmões. Os íons de Cl^- , nos pacientes FC, não são capazes de atravessar tais células e carregar água para a normalização da composição do muco brônquico, acarretando, assim, uma diferença de potencial elétrico através do epitélio, em indivíduos fibrocísticos, muito aumentada (50 mV), quando comparada com epitélio respiratório normal (20 mV) ⁷. Em 1982 e 1983, Quinton descobriu uma desregulação do íon Cl^- nas células epiteliais dos ductos das glândulas sudoríparas dos pacientes. Os trabalhos sugeriram que a permeabilidade excessivamente baixa do íon cloro na FC, nos ductos sudoríparas,

causava nestes baixa reabsorção do cloreto de sódio, produzindo, portanto, suor hipertônico. Quinton acreditou que um defeito generalizado na permeabilidade do íon cloro estava intimamente associado ao defeito fundamental da doença, desencadeando os problemas característicos do pâncreas, intestino e pulmões (Quinton, 1983).

Em 1985, dois pesquisadores, Knowlton e Wainwright, através de análises de ligação, e usando diferentes marcadores genéticos localizaram o gene candidato no braço longo do cromossomo 7 (Kreindler, 2010). Em 1989, num esforço colaborativo internacional, Tsui, Collins, Riordan e colaboradores identificaram um gene de 250 Kb responsável pela FC (Kerem *et al.*, 1989) e observaram que na maioria dos pacientes com fibrose cística o gene tinha uma alteração de três nucleotídeos que resultavam na deleção *in-frame* de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da proteína (F508del) (Kerem *et al.*, 1989).

A proteína codificada por este gene foi denominada pelo grupo de pesquisadores como “*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*” (CFTR); em seguida reconheceram que se a CFTR não era um canal de íons cloro, ela certamente tinha a função reguladora da atividade de um canal de Cl⁻ (Riordan *et al.*, 1989). Tais relatos representaram o ápice de vários anos de estudo e trabalho de muitos pesquisadores, em todo o mundo, e iniciaram uma nova era de esforços multidisciplinares com o objetivo de alcançar um tratamento ideal dessa doença limitadora da vida.

1.2. DESCRIÇÃO DA DOENÇA

A FC (OMIM 219700) é a doença genética mais comum em populações euro-descendentes. De caráter autossômico recessivo, afeta aproximadamente 1 em cada 2.500 nascidos vivos (Cutting, 2005), porém sua incidência pode variar de acordo com o grupo étnico. A Tabela 1 mostra a incidência de FC em diferentes países.

Tabela 1. Incidência de fibrose cística em diferentes países

País	Incidência (Nascidos vivos)	Referência
Irlanda	1 em 1.800	(Lucotte <i>et al.</i> , 1995)
França	1 em 1.800	(Welsh <i>et al.</i> , 2001)
Suíça	1 em 2.000	(Hergersberg <i>et al.</i> , 1997)
Itália	1 em 2.438	(Romeo <i>et al.</i> , 1989);
Espanha	1 em 3.500	(Lucotte <i>et al.</i> , 1995)
Alemanha	1 em 3.300	(Lucotte <i>et al.</i> , 1995; Romeo <i>et al.</i> , 1989)
África do Sul	1 em 6.500	(Welsh <i>et al.</i> , 2001)
México	1 em 8.500	(Grebbe <i>et al.</i> , 1994)
Emirados Árabes	1 em 15.876	(Frossard <i>et al.</i> , 1998; Frossard <i>et al.</i> , 1999)
Finlândia	1 em 25.000	(Lucotte <i>et al.</i> , 1995; Kere <i>et al.</i> , 1994)
Japão	1 em 323.000	(Welsh <i>et al.</i> , 2001)

No Brasil, a incidência da doença varia entre as diferentes regiões devido à grande heterogeneidade da população, sendo a frequência estimada para a Região Sul próxima à população europeia, decrescendo em direção a região Sudeste e

Norte do país. No Rio Grande do Sul, a estimativa da incidência da FC é de 1 em cada 1.587 indivíduos (Raskin *et al.*, 2008).

A principal patologia da FC é a acumulação de secreções espessas nas superfícies epiteliais de órgãos e sistemas, incluindo os pulmões (McCarthy & Harris, 2005), pâncreas (Gray *et al.*, 1995), intestino (Vankeerbergerghen *et al.*, 2002) e testículos (Kaplan *et al.*, 1968), o que resulta em bloqueio, infecção, inflamação e, em última análise, a insuficiência de órgãos. Assim, a FC se caracteriza também pela alta variabilidade clínica, pois ocorre o comprometimento de diversos sistemas corporais (Welsh *et al.*, 2001). Entre 1930 e 1940 era considerada uma “doença de infância” em que era rara a sobrevida acima de 5 anos. Hoje, com os avanços no diagnóstico e com as estratégias terapêuticas a expectativa de vida dos pacientes tem aumentado para uma idade mediana de sobrevida de 36,5 anos (Dalcin & Abreu e Silva, 2008).

As causas fundamentais da FC são mutações no gene *CFTR*, que causam a perda de função da proteína, que em condições normais atua como um canal de Cl⁻, e uma consequente perda de homeostasia iônica e de água nas superfícies epiteliais (Riordan *et al.*, 1989; Frizzell, 1999)

1.2.1. Manifestações Clínicas

A FC afeta células epiteliais de diversos órgãos, incluindo o trato respiratório, o pâncreas exócrino, o intestino, os vasos deferentes, o sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas exócrinas. O resultado é uma doença multissistêmica caracterizada por obstrução crônica das vias aéreas e infecções persistentes,

insuficiência pancreática exócrina, cirrose biliar multifocal, problemas de motilidade intestinal, infertilidade masculina e altos níveis de eletrólitos no suor (Welsh *et al.*, 2001). Aproximadamente 10% dos pacientes com FC têm manifestações clínicas somente em um dos órgãos e este fenótipo incompleto é chamado de FC atípica (Welsh *et al.*, 2001). Os aspectos clínicos da FC se caracterizam por mostrar heterogeneidade clínica, alguns indivíduos têm morte precoce, enquanto outros sobrevivem até a idade adulta (Zielenski, 2000; Merlo & Boyle, 2003; Simmonds *et al.*, 2010).

1.2.1.1. Glândulas sudoríparas

A secreção excessiva de cloreto de sódio por glândulas sudoríparas é característica de FC. Na verdade, a maioria dos pacientes diagnosticados com FC têm níveis de cloro no suor superiores a 60 mmol/L (Hardy *et al.*, 1973). Esta anomalia está presente ao longo de toda a vida do paciente desde o seu nascimento (Welsh *et al.*, 2001).

Em indivíduos saudáveis, a proteína CFTR é responsável pela reabsorção de cloreto (e, subsequentemente, de sódio) nos ductos reabsortivos das glândulas de suor, resultando em um suor hipotônico. A ausência ou a disfunção de CFTR impede este processo, dando origem ao suor com alta concentração de íons (Hardy *et al.*, 1973; Farrel & Kosciak, 1999). Essa perda excessiva de água e eletrólitos pode levar a colapso cardiovascular e, além disso, pode resultar em desidratação hipoclorêmica ou alcalose metabólica hipoclorêmica (Welsh *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2005). Estudos mostram que indivíduos normais têm a proteína CFTR com

atividade de 100% (nível médio de cloro no suor de 20 mmol/ L), enquanto portadores saudáveis têm atividade de 50% (nível médio de cloro no suor de 26 mmol/ L). No entanto, pacientes fibrocísticos com uma mutação grave e outra leve apresentaram uma concentração média de 80 mmol/L. Aqueles com duas mutações graves tinham as concentrações de cloro no suor mais altas, em média de 100 mmol/ L (Massie & Clements, 2005).

1.2.1.2. Pâncreas e Trato gastrointestinal

A insuficiência pancreática ocorre entre 90 e 95% dos pacientes com FC e é a única característica clínica bem correlacionada com o genótipo (Kristdis *et al.*, 1992). O pâncreas exócrino é responsável pela secreção de fluidos pancreáticos alcalinos e pela síntese e liberação de enzimas digestivas. A secreção de bicarbonato e água, e a síntese, estocagem e secreção pelas células acinares ocorrem no epitélio do ducto pancreático (Welsh *et al.*, 2001). Na secreção pancreática exócrina, a função do canal CFTR baseia-se no fato de que este canal encontra-se localizado na membrana apical das células epiteliais do ducto proximal (Ntimbane *et al.*, 2008).

A secreção defeituosa das enzimas digestivas, causada pela perda da função de CFTR, resulta na má absorção de gordura no sistema gastrointestinal (esteatorréia) e baixo peso corporal afetado pela carência nutricional (deficiência de antioxidantes lipossolúveis - vitaminas e carotenóides - e ácidos graxos essenciais). Além disso, o desequilíbrio iônico no trato biliar pode levar ao aumento de risco de pedra biliar e doença hepatobiliar (Massie *et al.*, 2000; Welsh *et al.*,

2001). Anormalidades pancreáticas também podem causar *diabetes mellitus* relacionada à FC e um dos fatores relacionados é a perda de função das células beta com progressiva fibrose das ilhotas de *Langerhans* (Ntimbane *et al.*, 2008).

A obstrução parcial ou incompleta do trato gastrointestinal causada pela insuficiência pancreática predispõe pacientes com FC. O íleo meconial (IM) que ocorre em 10-20% dos recém-nascidos com FC é uma forma de obstrução intestinal (Welsh *et al.*, 2001; Davis, 2001). O mecônio contém grande quantidade de proteína o que o torna extremamente espesso. Constipação recorrente e síndrome de obstrução intestinal distal são características em pacientes adultos com FC (Welsh *et al.*, 2001; Khaitov *et al.*, 2005).

1.2.1.3. Sistema Geniturinário

Aproximadamente 99% dos homens adultos com FC são inférteis devido à ausência bilateral congênita dos vasos deferentes (CBAVD – *congenital absence of the vas deferens*), que é um defeito de desenvolvimento o qual bloqueia o transporte de espermatozoides dos testículos ou do epidídimo para os canais deferentes, resultando em azoospermia (Rogan *et al.*, 2011; Radpour *et al.*, 2008).

De um modo geral, a infertilidade em mulheres com FC tem um resultado menos grave do que nos homens, mas suas causas ainda não foram totalmente elucidadas. Uma hipótese seria devido a espessura do muco cervical que pode limitar a passagem dos espermatozoides liberados no ducto vaginal (Chan *et al.*, 2009).

1.2.1.4. Sistema Respiratório

As manifestações clínicas mais graves da FC ocorrem no pulmão e nas vias respiratórias. Em tecidos brônquicos, a proteína CFTR é expressa nas glândulas submucosas e na superfície apical das células epiteliais ciliadas (Engelhardt *et al.*, 1992).

Normalmente, o transporte mucociliar eficaz é facilitado pela hidratação do líquido de superfície das vias aéreas (*airway surface liquid* - ASL), um importante lubrificante periciliar que reveste o trato das vias aéreas (Boucher, 2012; Goralski *et al.*, 2004).

A hidratação ASL é alcançada através do estabelecimento de um gradiente osmótico por um efluxo predominante de íons cloreto através dos canais CFTR, juntamente com um moderado influxo de íons de sódio através de canais epiteliais de sódio (*epithelial sodium channel* - ENaC) na membrana apical regulados pelo CFTR (Boucher, 2012; Goralski *et al.*, 2004).

A ausência ou disfunção de CFTR leva a uma falta de efluxo de cloreto e uma hiperabsorção não regulada de íons de sódio. Este desequilíbrio do gradiente osmótico provoca a desidratação ASL, aumento da viscosidade do muco e transporte mucociliar prejudicado (Goralski *et al.*, 2004; Derichs *et al.*, 2011). Sem intervenção, esta situação se deteriora gradualmente causando entupimento de pequenas vias respiratórias, infecção bacteriana, inflamação crônica local e, eventualmente, bronquiectasias (Rogan *et al.*, 2011; Derichs *et al.*, 2011; Flume & Van Devanter, 2012). Ainda, a diminuição das defesas nos pulmões permite o estabelecimento de bronquite bacteriana crônica, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, acompanhada por intensa inflamação e destruição das vias aéreas

(Welsh *et al.*, 2001). Além disso, as exacerbações pulmonares repetidas em indivíduos com FC têm contribuído para um declínio acelerado da função pulmonar, levando à falência pulmonar e morte ou ao transplante pulmonar (Waters *et al.*, 2012).

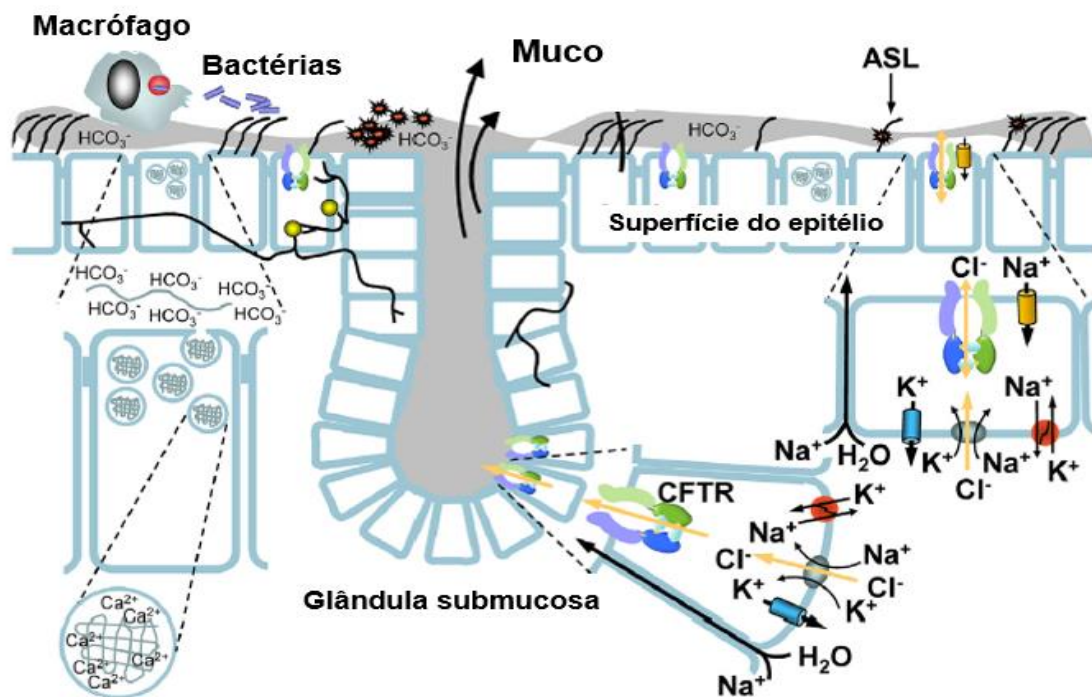


Figura 1. Função da proteína CFTR no transporte iônico transepitelial. A representação esquemática mostra uma fina camada de líquido na superfície das vias aéreas (ASL) que cobre o epitélio superficial e uma glândula submucosa. A atividade da CFTR e o canal epitelial de Na^+ (ENaC) na membrana apical controla a quantidade e a composição do ASL. Modificado de Wang *et al.*(2014).

1.2.2. Gene *CFTR*

O gene denominado regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator -CFTR*) está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.2), sua estrutura é composta de 27 éxons, abrangendo mais de 190 kb de DNA genômico. Este gene transcreve um RNA mensageiro de 6,5 kb, o qual é traduzido em uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, com peso molecular de 168 kDa (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989)

Estudos mostraram que o gene *CFTR* apresenta um padrão altamente regulado de expressão temporal e espacial. Análises dos níveis de RNA mensageiro por hibridização *in situ* demonstraram que o gene *CFTR* apresentou um alto padrão de expressão no epitélio do ducto pancreático, especialmente no ducto terminal. Elevados níveis de expressão de *CFTR* foram também observados nas criptas do epitélio do intestino delgado. Além disso, os estudos também mostraram que, em fetos, os padrões de expressão de *CFTR* são mantidos após o nascimento, exceto no sistema respiratório, em que há altos níveis de expressão nos pulmões de fetos diferentemente da baixa expressão observada em adultos (McCarthy & Harris, 2005).

Análises genômicas da sequência de 3,8 kb a montante do éxon 1 do gene *CFTR* revelaram um alto conteúdo GC (65%), a inexistência da sequência consenso TATA *box*, múltiplos sítios de início da transcrição tecido-específicos, e vários sítios com potencial para ligação aos fatores de transcrição Sp1 e AP1 (McCarthy & Harris, 2005).

1.2.3. Proteína CFTR

A proteína CFTR pertence à família de transportadores de membrana acoplados a ATP (*ATP-binding cassette* - ABC) composta por 1.480 aminoácidos (MacDonald *et al.*, 2007). A proteína está localizada na porção apical das células epiteliais dos pulmões, do intestino, do pâncreas, dos tecidos reprodutivos e das glândulas exócrinas.

A proteína é um canal iônico dependente de adenosina monofosfatada cíclica (*cyclic adenosine monophosphate* - cAMP) composto por cinco domínios: dois domínios transmembranares (*membrane-spanning domains* - MSD1 e MSD2) que formam o poro do canal, cada um com seis subunidades, um domínio regulador citoplasmático (R) que contém múltiplos sítios de fosforilação, e dois domínios de ligação de nucleotídeos (*nucleotide binding domains* - NBD1 e NBD2) (Kirk & Wang, 2011) (Figura 2).

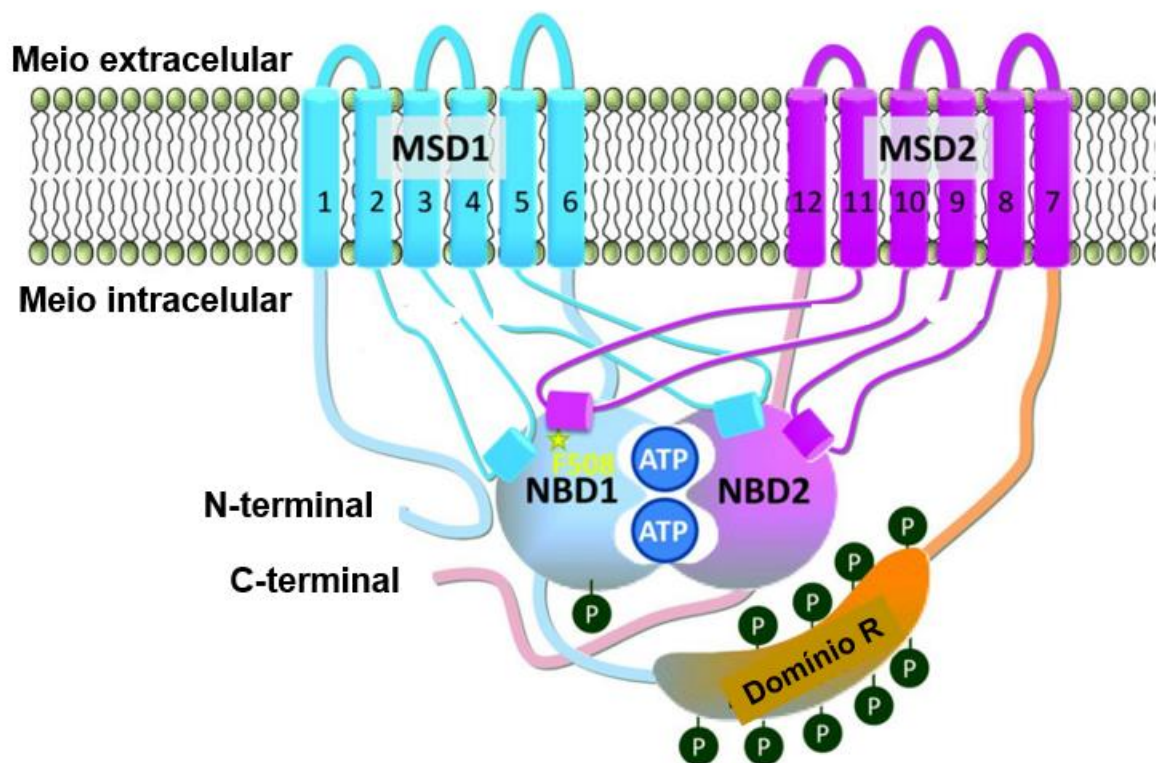


Figura 2. Diagrama esquemático da estrutura hipotética da proteína CFTR. CFTR é membro da superfamília de transportadores ABC que se utilizam da energia produzida pela hidrólise dos nucleotídeos para transportar moléculas através da membrana. A CFTR é composta por 5 domínios funcionais: dois domínios transmembranares (MSD1 e MSD2), dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) e um único domínio regulador (R) que se encontra fosforilado quando a proteína está ativa. Modificado de Kim Chiaw *et al.* (2011).

Os domínios MSDs contribuem para a formação do poro do canal de Cl^- , no entanto, a presença de mutações em sítios específicos dentro dos MSDs alteram sua seletividade a ânions (Rich *et al.*, 1990; Welsh & Smith, 1993). O domínio regulador R modula a atividade do canal e pode ter um efeito inibitório ou estimulatório (Rich *et al.*, 1993). Os domínios NBDs do CFTR são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP e fornecem a energia para a atividade do canal (Tsui, 1995).

Em condições normais, a proteína CFTR é regulada positivamente por fosforilação do domínio R. Diversas proteínas podem desempenhar esta função como cinase de tirosina, proteína cinase C (*Protein kinase C* - PKC) e a proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico (*Cyclic guanosine monophosphate* - cGMP). Porém, esta fosforilação é mediada principalmente por proteína cinase A (*Protein kinase A* - PKA). Na via de fosforilação por PKA, essa proteína é ativada pelo aumento da concentração de cAMP via ciclase de adenilil (*Adenylyl cyclase* - AC). Em seguida, o ATP intracelular se liga e é hidrolisado pelo NBD1 e assim o canal se abre e os íons Cl⁻ são transportados. Em contrapartida, a ligação e hidrólise de ATP pelo NBD2 leva ao fechamento do canal (Gadsby *et al.*, 2006). Todo o processo de abertura e fechamento do canal é apropriadamente denominado canal "*gating*".

Além de funcionar como um canal de Cl⁻, o CFTR também age como um regulador de condutância, exercendo assim, influências modulatórias sobre outros canais iônicos (Na⁺ e K⁺), sobre o transporte de proteínas e sobre processos como mecanismos de liberação de ATP, regulação de secreção de bicarbonato, produção de óxido nítrico, entre outros (Guggino & Stanton, 2006).

1.2.4. Mecanismos moleculares de disfunção da CFTR na FC

Até hoje, quase 2.000 variações de sequência, incluindo deleções, *missense*, *frameshift* e mutações *nonsense*, foram identificadas no gene *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). A maior parte dessas mutações são extremamente raras, à exceção da deleção de três pares de bases na posição 508

da sequência da proteína CFTR o que resulta na perda do aminoácido fenilalanina (denominada F508del). Aproximadamente 66% dos pacientes com FC apresentam F508del em todo o mundo (<http://www.genet.sickkids.on.ca/resourceTable1.html>). Algumas outras mutações são encontradas nas frequências de 1-5% no mundo, e menos de 20 mutações ocorrem em frequências superiores a 0,1%. No Brasil, a frequência da mutação F508del, segundo o registro brasileiro de FC (<http://www.gbefc.org.br/site/index.html>), é de 46%, variando entre cada estado.

A relação entre genótipo e fenótipo clínico na FC é um desafio. A grande maioria dos pacientes com FC (~ 85%) sofrem com insuficiência pancreática exócrina (*pancreatic insuficiente* - PI). A maior parte do restante retém a função pancreática exócrina significativa (*pancreatic suficiente* - PS) (Bombieri *et al.*, 2011).

No entanto, alguns pacientes são difíceis de diagnosticar pois, apresentam SP e ao longo da vida desenvolvem alguma doença pulmonar mais branda. Esses casos são portadores de fibrose cística atípica (Bombieri *et al.*, 2011). Além disso, algumas disfunções geradas pela proteína CFTR ocorrem em um único órgão, por exemplo a ausência bilateral congênita do canal deferente. Estas condições são distintas da FC e são denominadas desordens relacionadas com a CFTR (CFTR-*related disorders* – CFTR-RD) (Bombieri *et al.*, 2011).

Drumm *et al.* (1991) demonstraram pela primeira vez que, quando as mutações FC são expressas em oócitos de *Xenopus*, a quantidade de corrente gerada pelo íon Cl⁻ (mediado por CFTR) é reduzida nesta ordem de classificação: selvagem > FC-PS > FC-PI. Esses resultados sugerem uma relação entre o genótipo, o fenótipo clínico e a função da CFTR.

Para compreender melhor essa relação, foram estudados os efeitos das mutações associadas à FC no processamento, na estabilidade na membrana plasmática e na função de canal da proteína CFTR. Esses estudos identificaram seis mecanismos gerais de disfunção da CFTR: (I) produção defeituosa da proteína, (II) processamento defeituoso da proteína, (III) regulação defeituosa do canal, (IV) condução defeituosa do canal, (V) síntese reduzida da proteína e (VI) redução da estabilidade da proteína (Figura 3) os quais têm sido utilizados para classificar as diferentes mutações da FC.

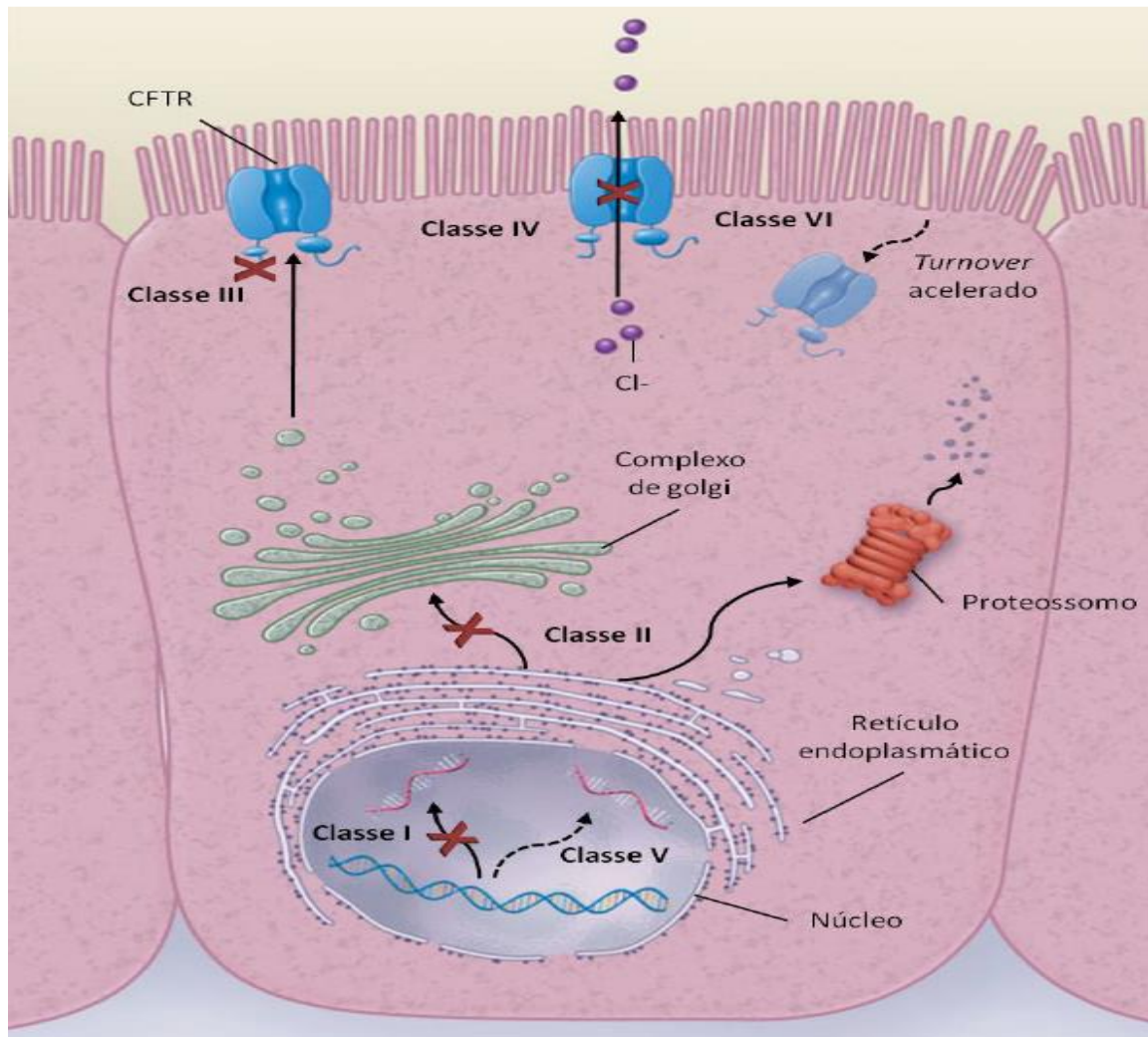


Figura 3. Classes das mutações de CFTR. As Classes das mutações no gene *CFTR* incluem: a ausência de síntese (classe I); maturação proteica defeituosa e degradação prematura (classe II); regulação desordenada tais como a diminuição de ligação e hidrólise de ATP (classe III); condutância ao cloro defeituosa ou a abertura do canal alterada (classe IV); número reduzido de transcritos CFTR (classe V) e “turnover” acelerado e precoce na superfície celular (classe VI). Modificado de Steven *et al.* (2005).

1.2.4.1. Classe I: Ausência da síntese proteica

Pertencem a essa classe as mutações *nonsense* (geram um códon de terminação prematuro UAA, UAG ou UGA- *premature termination códon*, PTC), *frameshift* (deslocam a fase aberta de leitura) ou de *splicing* (geram ou destroem o sinal de *splicing* do éxon-ítron), impedindo, assim, a formação do seu RNA mensageiro funcional (Welsh & Smith, 1993; Tsui, 1995; Rowe *et al.*, 2005). A frequência mundial de mutações *nonsense* no gene *CFTR* é de aproximadamente 8% (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Os principais exemplos incluem G542X, a segunda mutação mais comum em fibrocísticos, prevalente nos países do Mediterrâneo e W1282X, a mutação mais comum em judeus Ashkenazi.

1.2.4.2. Classe II: Defeito no processamento da proteína

Mutações de classe II são caracterizadas pela ausência do processamento da proteína CFTR, o que resulta na ausência de proteínas funcionais, como um canal de Cl⁻, na membrana plasmática (Figura 3) (Welsh & Smith, 1993; Rowe *et al.*, 2005). É a classe que apresenta o maior número de mutações descritas (Vankeerberghen *et al.*, 2002; Belcher & Vij, 2010).

O principal exemplo de mutação de classe II é a F508del localizada em NBD1, a qual gera uma deleção de 3 pb no éxon 10 do gene *CFTR*, ocasionando a perda da fenilalanina na posição 508 da proteína. F508del resulta em um polipeptídeo com dobramento incorreto, que é reconhecido pelo mecanismo de

controle de qualidade do retículo endoplasmático, marcado com ubiquitina e posteriormente degradado pelo proteassomo presente no citosol (Faria *et al.*, 2014). Ou seja, a proteína CFTR com F508del é sintetizada, mas não é transportada para a membrana celular por apresentar dobramento incorreto. Porém, alguns estudos sugerem que uma quantidade residual de CFTR consegue alcançar a membrana plasmática em pacientes homozigotos F508del (Rowntree & Harris, 2003). No entanto, a proteína mutante é altamente instável exibindo, assim, um defeito grave de canal de Cl⁻ (Dalemans *et al.*, 1991). Em 2000, Mickle e colaboradores definem esses pacientes homozigotos, como os que possuem o fenótipo clássico da doença (Mickle & Cutting, 2000).

1.2.4.3. Classe III: Defeito na regulação do canal de Cl⁻

Estas mutações são frequentemente localizadas nos NBDs. Nesta classe, ocorre a síntese e o posicionamento da proteína na membrana celular, mas seu funcionamento é afetado devido ao fato de não responderem à estimulação por cAMP. São mutações do tipo *missense* que ocasionam a substituição de um par de bases por outro, levando à formação de um códon que codifica um aminoácido diferente do original. O principal exemplo é G551D, que está associada ao fenótipo mais grave da doença. Esta mutação interfere na interação do NBD1 com o ATP intracelular, resultando numa probabilidade de abertura do canal de Cl⁻ 100 vezes mais baixa em comparação com o tipo selvagem (Anderson *et al.*, 1991). Outros exemplos de mutações desta classe são R560T e G970R.

1.2.4.4. Classe IV: Defeito na condução do canal de Cl⁻

Estas mutações estão localizadas principalmente dentro dos MSDs do CFTR envolvidos na constituição do poro do canal (Figura 2). As mutações *missense* localizadas nestas regiões permitem a produção da proteína que é transportada e inserida corretamente na membrana celular, é estimulada por cAMP, porém gera um fluxo reduzido de íons Cl⁻.

Alelos nesta classe são tipicamente associados com a forma mais branda da doença. Alguns exemplos de mutações desta classe são a R117H (próximo ao MSD2), G314E (no MSD5), R334W e R337P (no MSD6) (Zielenski & Tsui, 1995).

1.2.4.5. Classe V: Redução da síntese proteica

As mutações de classe V geram canais de Cl⁻ com a função normal, porém em quantidade reduzida em comparação com os níveis de expressão tecidual do tipo selvagem. Nessa classe de mutações da FC se incluem mutações nas regiões promotoras que reduzem a transcrição do gene (por exemplo, 125 G → C), alterações de nucleotídeos que promovem *splicing* alternativo de transcritos do *CFTR* (por exemplo, 3849 + 10 Kb C → T) e de substituições de aminoácidos, que causam a maturação da proteína ineficiente (por exemplo, A455E) (Zielenski & Tsui, 1995).

1.2.4.6. Classe VI: Redução da estabilidade proteica

Com base em estudos bioquímicos com mutações *nonsense* e mutações *frameshift*, pesquisadores propuseram que algumas mutações da FC diminuem a estabilidade da proteína CFTR na membrana plasmática (Figura 3) por mecanismos ainda não esclarecidos, sendo rapidamente removidas e degradadas pela maquinaria celular. Dentro desta classe, podem ser citadas as mutações Q1412X, N287Y, 120del23, 4326delITC e 4279insA.

1.2.5. Correlação genótipo-fenótipo

As mutações no gene *CFTR* foram categorizadas historicamente com base nos mecanismos em efeitos previstos sobre a biossíntese de CFTR, o processamento, a regulação do canal, a condutância do canal, a diminuição dos níveis de transcritos e a estabilidade da proteína. Este sistema de classificação tem a vantagem de caracterizar as mutações por (muitas vezes prevista) defeito funcional, e ajuda a categorizar os alvos das novas classes de terapias moleculares.

Entretanto, essa classificação não é totalmente utilizada em predições clínicas porque este sistema tem limitações significativas devido à falta de correlação da classe de mutação com características clínicas, apesar de algumas generalizações úteis serem observadas.

Em geral, as classes I, II e III tendem a ter a função mínima da proteína e as consequências mais graves da doença. Este fenótipo grave está associado com insuficiência pancreática (Ahmed, 2003; Gibson-Corley *et al.*, 2016), íleo meconial (Dupuis *et al.*, 2015), diabetes relacionada à FC (Ntimbane *et al.*, 2008) e doenças no fígado (Hermann *et al.*, 2010). Classes IV, V e VI representam as mutações com um fenótipo mais brando. A presença de pelo menos um alelo com função residual (selvagem) confere a melhoria do estado nutricional e doença pulmonar menos grave (Kerem, 2006; Culling & Ogle, 2010).

No entanto, a potencial influência da mutação no fenótipo não depende somente da sua natureza, localização no gene e mecanismo molecular, mas também da sua interação com o segundo alelo de CFTR mutado e com modificadores da doença. Embora a FC seja considerada uma doença monogênica, estudos de correlação entre o fenótipo clínico e o genótipo revelaram uma relação muito complexa (Gallati, 2014). Algumas características fenotípicas estão intimamente determinadas pelo genótipo de forma essencialmente monogenética, entretanto, outras são fortemente influenciadas por modificadores gênicos e pelo meio ambiente.

Estudos mostram que existe uma forte relação entre o genótipo de CFTR e o fenótipo pancreático, revelando que mutações “graves” (por exemplo, F508del e todas as mutações de classe I) estão associadas à insuficiência pancreática, enquanto mutações “leves” (classe V e VI) são associadas à suficiência pancreática. Interessantemente, pacientes com SP que carregam duas mutações leves estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de pancreatite do que pacientes com mutações ditas “moderadas” (classe III e IV) ou pacientes heterozigotos

compostos com mutações moderada/severa, correlacionando com a função residual de CFTR e com a reserva pancreática de células acinares. Por outro lado, devido à sua complexidade e a exposição do paciente a uma multiplicidade de fatores endógenos e exógenos, os sintomas pulmonares são mais variáveis. Com isso, a expressão do gene *CFTR* em diferentes órgãos de um mesmo indivíduo pode apresentar um alto grau de variabilidade, tornando o diagnóstico e abordagens terapêuticas mais complicadas.

Assim, os estudos clássicos sobre as relações entre genótipo e fenótipo são importantes, mas não suficientes e devem ser complementados pela busca, do fenótipo clínico, de efeitos ambientais e também de genes modificadores da FC a fim de melhorar o conhecimento dos mecanismos da doença e desenvolver novas abordagens diagnósticas e terapêuticas.

1.2.6. Diagnóstico da FC

Devido à ampla variedade de sinais e sintomas, o diagnóstico clínico da FC e de CFTR-RD torna-se difícil, principalmente na infância. Por outro lado, o diagnóstico precoce, pode retardar a insuficiência do pâncreas, prevenir a desnutrição e permitir um tratamento rápido das infecções pulmonares, melhorando, assim, o prognóstico e a qualidade de vida do paciente. Por essas razões, os programas de triagem neonatal implantaram o diagnóstico de FC em todo o mundo (Castellani & Massie, 2010; Lai *et al.*, 2005).

O procedimento de triagem neonatal do sistema único de saúde (SUS) mais utilizado no Brasil é baseado em uma ou duas dosagens (ao nascer e, mais tarde, entre a terceira e quinta semana de vida) de tripsinogênio imunorreativo (*immunoreactive trypsinogen* - IRT), possivelmente combinado com o teste do suor que faz a análise da concentração dos íons Cl⁻. Em alguns estados, a confirmação do diagnóstico é realizada com a análise da mutação mundialmente frequente (F508del), pois existe uma taxa elevada de resultados falsos positivos e possibilidade de falsos negativos.

1.2.6.1. Dosagem quantitativa do tripsinogênio imunorreativo

O diagnóstico de FC se dá pela realização da triagem neonatal, recomendada pelo Ministério da Saúde (MS) que se baseia na dosagem de IRT. Este teste detecta o tripsinogênio, que está elevado nos fibrocísticos e permanece elevado até 30 dias de idade (Rosa *et al.*, 2008). O tripsinogênio é a forma precursora da enzima pancreática tripsina produzido pelos ácinos pancreáticos. Porém, crianças com FC têm seus ductos pancreáticos bloqueados, impedindo, desta forma, o tripsinogênio de alcançar o intestino e ser convertido em tripsina. Assim, ocorre um aumento da concentração de tripsinogênio na corrente sanguínea (Mishra *et al.*, 2005; Boeck *et al.*, 2006).

1.2.6.2. Teste do suor

Na FC, o teste laboratorial confirmatório mais utilizado é o teste do suor. O método consiste na estimulação da produção de suor pela policarpina, que é colocada sobre a pele, utilizando um gradiente potencial (iontoforese), com posterior determinação química da concentração de Cl^- por colorimetria, coulometria ou por eletrodo íon-seletivo e de Na^+ por fotometria de chama (Gibson & Cooke, 1959).

O resultado de um teste de suor com a concentração de Cl^- maior ou igual a 60 mmol/L é considerado positivo para FC. Valores até 39 mmol/L são considerados negativos e valores entre 40 e 59 mmol/L são intermediários, podendo ou não ser FC. A concentração de cloro no suor para diagnóstico de FC em adolescentes e adultos deve ser de 80 mmol/L ou mais. Esse exame, porém, deve ser interpretado adequadamente no contexto da idade do paciente, do quadro clínico apresentado e da experiência do médico em diagnosticar FC.

É de conhecimento a existência de casos de indivíduos que apresentam sintomas clínicos indicativos de FC, muito embora, apresentem níveis de cloro normais ou dentro dos limítrofes no teste de suor. Tais indivíduos geralmente apresentam a manifestação dos sintomas tardia, já na fase adulta. Esses indivíduos possuem estado nutricional normal, mantêm a suficiência pancreática e exibem ausência de vasos deferentes (homens) (Mishra *et al.*, 2005). Tais casos são exemplos onde testes posteriores complementares, tais como testes genéticos, se fazem necessários.

1.2.6.3. Teste molecular

A análise das mutações relacionadas à FC pode ajudar a estabelecer o diagnóstico em pacientes em que o teste do suor é limítrofe. Além disso, a análise molecular auxilia também no prognóstico e na epidemiologia da doença, permite a identificação de portadores de alelos para FC e a predição de mutações no gene *CFTR*.

A detecção da presença de duas mutações relacionadas à doença confirma o diagnóstico de FC, podendo o indivíduo ser portador de uma mesma mutação nos dois alelos do *CFTR* (homozigoto) ou portador de duas mutações diferentes em *CFTR* (heterozigoto composto). Entretanto, o achado de uma única mutação (heterozigoto) deve ser associado à confirmação de disfunção da *CFTR*, além de manifestações clínicas compatíveis com FC. A não detecção de mutações não exclui o diagnóstico de FC (Chmiel *et al.*, 1999; Gallati, 2014) .

Atualmente existem testes comerciais disponíveis, os quais são capazes de detectar entre 25 a 35 diferentes mutações no gene *CFTR*. Entretanto, esses testes possuem dois pontos negativos: o seu elevado custo, inacessível à maior parte da população brasileira e mesmo mundial, e os seus alvos, que são as mutações recomendadas pela *American College of Medical Genetics (ACMG)*. Devido à grande heterogeneidade racial no Brasil, estes testes comerciais não têm a sensibilidade para detecção de mutações presentes na população do estado Rio Grande do Sul. Sabe-se hoje da existência de mais de 2.000 mutações no gene *CFTR* associadas à fibrose cística. Cabe, portanto, padronizar técnicas,

preferencialmente de menor custo, que sejam capazes de detectar mutações de forma mais direcionada àquelas que ocorrem com maior frequência em nossa população.

1.3. EXTENSÃO DE BASE ÚNICA (SNaPshot) PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

A extensão de base única (*single-nucleotide primer extension- SNaPshot*) é um método utilizado para a genotipagem de polimorfismos de única base (single nucleotide polymorphism - SNP) que pode ser aplicado em estudos de associação e mapeamento genético, ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade, identificação individual (rastreadabilidade), detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção entre outros (Sobrinho & Carracedo, 2005; Butler, 2011).

Além disso, essa metodologia permite a análise simultânea de 10 ou mais SNPs em uma mesma reação, possibilitando maior sensibilidade do diagnóstico, redução da velocidade laboratorial e dos custos de materiais.

O SNaPshot é baseado na extensão de um único dideoxynucleotídeo (marcado com fluorescência). A reação de extensão do primer (oligonucleotídeos) é realizada a partir de um fragmento amplificado e purificado. *Primers* específicos para a reação de SNaPshot (oligonucleotídeos de tamanhos diferentes que são anelados exatamente em um nucleotídeo adjacente a região do SNP alvo) são utilizados para a investigação de cada mutação. Os *primers* ligam-se às regiões

complementares, na presença de ddNTP marcado com fluorescência (A: verde; T: vermelho; C: preto; G: azul) e de DNA polimerase AmpliTaq®. Em seguida, a DNA polimerase adiciona um único ddNTP na extremidade 3' de cada iniciador, de acordo com a complementaridade da sequência. Uma vez que a reação contém apenas DNA molde, *primer* e ddNTP (não inclui dNTP), a interrupção da reação ocorre logo após a incorporação de apenas um dideoxi terminador. Esse processo é repetido em ciclos sucessivos de extensão e de terminação, podendo então ser analisados, por eletroforese capilar, os produtos resultantes que variam na cor (ddNTP marcado) e no tamanho (Figura 4) (Fiorentino *et al.*, 2003).

As cores dos picos finais são determinadas pelo genótipo específico neste locus, tornando-se possível identificar a variação da base. O local da mutação pode ser, assim, de forma fiel diferenciado entre o tipo selvagem e o mutante homocigoto (um pico de uma cor específica) ou heterocigoto. Nesse último caso, dois picos de diferentes cores ocorrem no eletroferograma, um derivado da base normal e outro a partir da base mutada. O tamanho de cada pico é determinado pela extensão do *primer*, bem como pela incorporação do ddNTP marcado com fluorescência específica, cuja estrutura química produz mobilidade eletroforética diferente. Tal fato resulta na visualização de dois picos diferentes separados em amostras de heterocigotos (Fiorentino *et al.*, 2003).

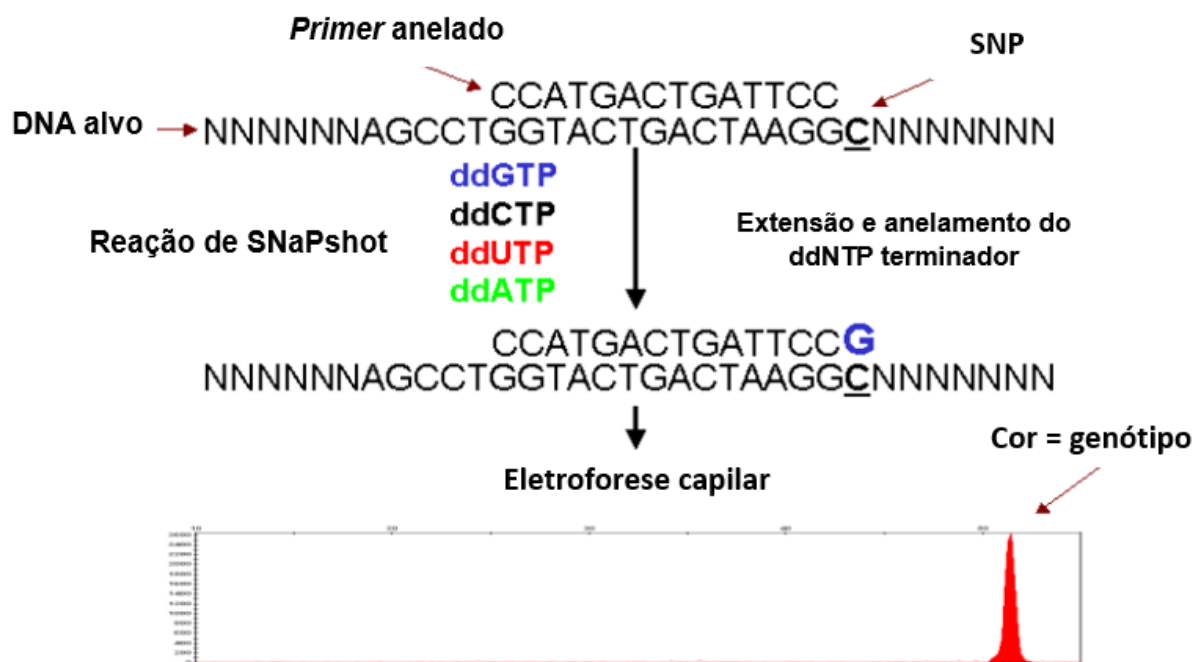


Figura 4. Esquema da reação com o kit ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex. Modificado de Applied Biosystems.

O SNaPshot necessita de apenas uma reação por DNA ou amostra do paciente e sua interpretação dos padrões de pico é simples e pode ser automatizada. O emprego de um marcador padrão (*size calibrator – GeneScan-120LIZ*) assegura a reprodutibilidade entre as diferentes corridas e, além disso, facilita a chamada automatizada do alelo. Assim, o método de SNaPshot aumenta consideravelmente a praticidade e agilidade do trabalho laboratorial de rotina.

1.4. TRATAMENTO

Atualmente, o tratamento indicado para pacientes com fibrose cística tem como objetivo o adiamento das infecções pulmonares, controle das deficiências

enzimáticas, prevenção e/ou correção das disfunções nos sistemas comprometidos e alívio dos sintomas.

A eliminação das secreções viscosas das vias aéreas geralmente é a primeira medida para as disfunções pulmonares, evitando as infecções crônicas endobronquiais, as quais são a maior causa de mortalidade de FC. Vários medicamentos como, antibióticos, anti-inflamatórios, broncodilatadores e mucolíticos são administrados. Além disso, alguns procedimentos como, reposição de enzimas digestórias, suporte nutricional, fisioterapia respiratória, oxigenoterapia, transplante de pulmão, suporte psicológico e terapia gênica podem ser necessários, juntamente com uma equipe multidisciplinar de profissionais (Rosa *et al.*, 2008).

Após mais de 20 anos de pesquisas básicas e aplicadas, o conhecimento sobre a proteína CFTR e seus mecanismos moleculares de disfunção permitiu o desenvolvimento de tratamentos baseados nos sintomas, os quais melhoraram consideravelmente a qualidade de vida e prognóstico dos pacientes, e a verdadeira possibilidade de terapias personalizadas mais eficazes.

Além disso, uma promessa de correção primária do defeito da proteína também surgiu. Uma vez que o aspecto clínico mais grave são problemas respiratórios, o tecido alvo destas terapias é o epitelial pseudoestratificado das vias aéreas (Johnson *et al.*, 1992; Farnen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Uma normalização do transporte de íons e água no epitélio respiratório, pode ser alcançada com a correção de menos de 25% das células epiteliais das vias aéreas.

Em torno de 20% dos indivíduos com FC, tem pelo menos uma mutação com terminação prematura em códon, de classe I. Antibióticos da família dos

aminoglicosídeos se mostram eficazes em suprimir o efeito das mutações que introduzem códons de terminação prematuros, permitindo, assim, a produção da proteína CFTR funcional (Pettit, 2012).

Estudos *in vitro* e em leveduras mostraram que chaperonas químicas, moleculares ou farmacológicas, usualmente chamadas de corretores (do processamento/tráfego), mostraram-se produtivas em promover o correto enovelamento e estabilização da estrutura proteica nas mutações de classe II (Amaral & Kunzelmann, 2007; Becq *et al.*, 2011; Rogan *et al.*, 2011).

Por meio do aumento da ativação da proteína CFTR mutada e/ou estendendo a sua meia-vida, algumas drogas agem como potenciadores (de função) e são adequados para atingir as mutações de classes III, IV e V. As mutações de classe VI podem ser atingidas por potenciadores ou supressores de códons de terminação "*in-frame*" (Karijovich & Yu, 2011).

Tabela 2. Classes de mutações CFTR e possíveis intervenções terapêuticas personalizadas. Modificado de Lucarelli *et al.* (2011).

Classe das mutações	Efeito na proteína CFTR	Tipo de mutações	Exemplos	Terapia mutação-específica
I	Ausência da síntese proteica	Códon de parada prematuro por: mutações sem sentido " <i>nonsense</i> " ou em sítio de " <i>splicing</i> " ou pequenas/grandes deleções ou inserções	G542X W1282X 1717-1G>A	Supressores
II	Defeito no tráfego até a membrana ou no processamento	Códon de parada prematuro por: mutações sem sentido " <i>nonsense</i> " ou em sítio de " <i>splicing</i> " ou pequenas/grandes deleções ou inserções	F508del G85E N1303K	Corretores (Chaperonas químicas, biológicas ou farmacológicas)
III	Defeito na regulação proteica (da abertura do canal)	Sentido trocado " <i>missense</i> " ou pequenas deleções/inserções	G551D	Potenciadores
IV	Redução da condutância	Sentido trocado " <i>missense</i> " ou pequenas deleções/inserções	R117H R334W R347P	Potenciadores
V	Redução da síntese proteica	Sentido trocado " <i>missense</i> " ou em sítio de " <i>splicing</i> "	2789+5G>A A455E 3272-26A>G	Potenciadores
VI	Redução da estabilidade proteica	Sentido trocado " <i>missense</i> " ou sem sentido " <i>nonsense</i> "	4326delTC 4279ins A Q1412X	Supressores

2. JUSTIFICATIVA

Em 2001, o Programa Nacional de Triagem Neonatal instituiu a realização de teste por biologia molecular para a confirmação da Fibrose Cística no âmbito do SUS. No Estado do Rio Grande do Sul (RS), esse teste está sendo realizado através da análise apenas da mutação mais frequentemente encontrada no gene *CFTR*, a F508del. Considerando que atualmente, cerca de 2.000 mutações já foram descritas na literatura, o presente projeto de mestrado tem como objetivo buscar o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico molecular custo-efetiva que amplie o número de mutações pesquisadas pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do RS. A obtenção dessa nova ferramenta diagnóstica poderá ser aplicada a fim de tornar o diagnóstico mais personalizado, com reflexos no manejo do tratamento, aconselhamento genético, prognóstico e qualidade de vida do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Detectar mutações no gene *CFTR* em pacientes com suspeita de Fibrose Cística triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Rio Grande do Sul.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o método de extensão de base única (SNaPshot) para detecção de mutações no gene *CFTR*;
- Identificar a presença das 11 mutações (R1162X, G85E, R117H, 2789+5G>A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G>A, 3120-1G>A e G551D) no gene *CFTR* pelo método de SNaPshot em pacientes com suspeita de FC;
- Genotipar as amostras por hibridização reversa (teste de genotipagem comercial) e por sequenciamento;
- Estabelecer a frequência dessas mutações na população analisada;
- Avaliar o desempenho do método otimizado contra o sequenciamento e o teste comercial.

- Padronizar a extração de DNA a partir de sangue seco em papel filtro S&S903.
- Identificar a presença da mutação F508del em pacientes com suspeita de fibrose cística da triagem neonatal e que foram a óbito.

4. Manuscrito 1: “SNaPshot of *CFTR* gene: an alternative strategy to confirm Cystic Fibrosis”

ARTIGO

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de manuscrito que será submetido à publicação na revista *Journal of Molecular Diagnostics*.

SNaPshot of *CFTR* gene: an alternative strategy to confirm

Cystic Fibrosis

Thaiane Rispoli Serrano^{1,3}, Simone Martins de Castro², Mayara Jorgens Prado^{1,3},

Cláudia Maria Dornelles da Silva³, Tarciana Grandi³, Letícia Filippon², Maria

Lucia Rosa Rossetti^{3,4}.

¹Centro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Serviço de Referência em Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, Brazil.

³Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre, Brazil.

⁴Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

Number of text pages: 27

Number of tables: 4

Number of figures: 3

Short running head: Cystic Fibrosis confirmation by SNaPshot

Grant numbers and sources of support: Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul (SES/RS), Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) e do Programa de Iniciação Científica (BIC/UFRGS).

***Address to correspondence and reprint requests:**

Maria Lucia Rosa Rossetti, PhD

Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) - Fundação Estadual de
Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)

Av. Ipiranga 5400, 3º andar

CEP 90.610-000 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Phone/Fax: +55 51 3288.4000 / +55 51 3352.0336

E-mail: mrossett@terra.com.br

ABSTRACT

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease with high incidence in euro-descendant populations (1: 2500 live births) and is caused by mutations in the *CFTR* gene. Approximately 2,000 mutations have been identified, being the most prevalent F508del. These mutations cause dysfunctions in the CFTR protein that regulates the passages of chloride and sodium ions across cell membranes, leading to different degrees of clinical manifestations. In 2012, CF newborn screening was implemented in population of State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil, just for the F508del mutation. In order to increase the number of mutations studied, the aim of this work is to standardize a molecular detection method for eleven mutations (R1162X, G85E, R117H, 2789 + 5G> A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G> A, 3120-1G> A and G551D) in *CFTR* gene and evaluate the frequencies of them in patients with CF suspicion. SNaPshot was the method standardized to genotyping. A commercial assay and DNA sequencing were the techniques used to validate this methodology. The SNaPshot had 100% agreement with the other two methods. The study was composed of 34 patients with CF suspicion. The allele frequencies of mutations found by SNaPshot assay were: G542X (5.9%), R334W (1.5%), W1282X (2.9%), 3120-1G>A (2.9%). The genotypes found, complementary to the information of F508del, were: 9 (26.5%) F508del/unknown, 2 (5.9%) G542X / F508del, 1 (2.9%) 3120-1G>A / F508del, 1 (2.9%) R334W / F508del, 1 (2.9%) G542X / G542X, 1 (2.9%) 3120-1G>A / unknown, 1 (2.9%) W1282X/F508del and 1 (2.9%) W1282X/ unknown. In conclusion, the SNaPshot was successfully used to genotype 11 mutations in the *CFTR* gene. This application will allow better targeting of the treatment, genetic counseling, prognosis and quality of patients life.

INTRODUCTION

26

27

28 Cystic fibrosis (CF; OMIM 219700) is the most common genetic disease of the euro-
29 descendant population, with a very variable prevalence, from 1/900 to 1/25,000, depending
30 on the geographical region ^{1,2}. This autosomal recessive disease is caused by mutations in
31 the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene (region 7 q3.11),
32 which encodes an epithelial anion channel. It is an ATP- and cAMP-dependent Cl⁻ channel
33 with the main function performed at the apical membrane of epithelial cells ³.

34 This function is the Cl⁻ ion secretion in the colon and airways, or its reabsorption in
35 sweat glands ^{2,4}. In the lung, the main targeted organ of CF, an additional crucial function
36 performed by *CFTR* is the regulation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) activity ⁵. About
37 2.000 mutations (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>) of this gene were
38 identified and has provided the knowledge base for the genotypic and phenotypic analysis
39 of CF patients.

40 Most of this mutations do not result in CF, but some diseases accelerate mutation
41 rates resulting in more severe forms of CF ^{6,7}. *CFTR* mutations lead to the absence or
42 dysfunction (quantitative and/ or qualitative) of the *CFTR* protein, altering chloride transport
43 at the cell surface.

44 The F508del mutation is the most prevalent, responsible for more than 48% of CF
45 alleles in Rio Grande do Sul population ⁸. Other common known mutations include R1162X,
46 G85E, R117H, 2789+5G>A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G>A, 3120-1G>A
47 and G551D, that with F508del account for 58,3% of all mutations.

48 The identification of mutations in the *CFTR* gene are very important, since the
49 disease diagnosis is based on the criteria of patient presenting at least one clinical symptom,

50 associated with the evidence of CFTR dysfunction⁹. Sweat test is performed to detect protein
51 dysfunction due to high concentration of chloride, but this test is subject to errors, resulting
52 in false-positive or false-negatives¹⁰. Due to the high number of mutations that cause CFTR
53 dysfunction, tests which enhances performance are necessary.

54 The aim of this study was to detect 11 CFTR mutations using SNaPshot technique,
55 in a panel that covers the most prevalent in Rio Grande do Sul state and in Brazil, and apply
56 this protocol in patients with clinical suspicion of CF.

57

58

59 MATERIALS AND METHODS

60

61

62 Samples

63

64

65 A total of 34 DNA samples were screened for CFTR mutation using the newly
66 standardized CFTR SNaPshot assay. The DNA from peripheral blood was isolated by salting
67 out¹⁰¹ from newborns with cystic fibrosis suspicion screened by the Reference Service for
68 Neonatal Screening of Rio Grande do Sul. The criteria for selection of subjects were:

69 two altered IRT,

70 sweat test borderline or altered and

71 molecular test for F508del (Wt/ Wt or F508del/ Wt).

72

73 The DNA extracted concentration was assessed by fluorometry analysis using a Qubit
74 fluorimeter according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

75 To validate and determine the reproducibility and performance (specificity and
76 sensitivity) of the single-nucleotide primer extension (SNaPshot) method for detection of

77 CFTR mutations, this 34 samples were genotyped using commercial genotyping kits Inno-
78 LiPA CFTR19 and Inno-LiPA CFTR17+Tn Update Kits (Innogenetics, Ghent, Belgium)
79 and sequenced.

80 The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Materno Infantil
81 Presidente Vargas (HMIPV), and all subjects have given written informed consent for
82 participation in the study.

83

84 **Selection of mutations**

85

86 The mutations to compose the panel were selected according their previously
87 described potential relevance in Rio Grande do Sul (RS) and in Brazil population among
88 2,000 those described^{8,12-15}. In addition, for the inclusion of mutations in the panel the most
89 frequent mutations in European populations (populations mainly from Italy, Spain, Portugal,
90 Germany) deposited on the CF mutation database “CFTR1” ([http://www.genet.sckkids](http://www.genet.sckkids.on.ca/cftr)
91 [.on.ca/cftr](http://www.genet.sckkids.on.ca/cftr)), was also considered, since there was a great migration of European people to
92 this State and that were also present in the commercial test.

93 A second CF mutation database “CFTR2” (<http://www.cftr2.org>) was also used. It
94 gathers up to date information about newly discovered CFTR gene mutations, classifies them
95 as disease-causing, neutral or mutation of varying clinical consequences, and provides
96 clinical information about specific mutation combination.

97

98

99

100

101 **Multiplex PCR-primers and SNaPshot primers design**

102

103

104

105

106

107

108

109

110

The SNaPshot method is based on hybridization of oligonucleotide primer adjacent immediately to the variant nucleotide analyzed and extension with complementary fluorescently labeled dideoxynucleotide (ddNTP). The templates for annealing and extension of a primer were previously amplified PCR fragments that contains the sequences of interest. Eleven different DNA fragments with length from 152 bp to 388 bp were amplified in a multiplex reaction, and were used for the detection of CFTR mutations (Table 1).

111

112

113

114

The design of the multiplex PCR (Table 1) and SNaPshot primers mix (Table 2) were performed using Primer3 software v.0.2 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), while the specificity was confirmed using BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

115

116

117

118

119

120

The guidelines for multiplex PCR primers design included the following parameters: a) design primers at most 20 nucleotides in length with closely melting temperature among primers; b) all the amplicons were in the range of 150-400 bp to facilitate visualization of the multiplex reactions and to avoid preferential amplification by reagents competition. All of them were synthesized and purified and checked with mass spectrometry by IDT - Integrated DNA Technologies Company.

121

122

123 **Multiplex PCR amplification**

124

125

126

127

128

The multiplex PCR amplification was performed in 25 µl reaction volume with 20ng genomic DNA. In addition, each reaction contained 12.5 µl of 1x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 80 nM of R117H primers, 400 nM of G551D primers, 1200 nM of R553X

129 primers, 160 nM of W1282X, R334W, R1162X, 3120+1G>A primers, 240 nM of 1717-
130 1G>A, 2789+5G>A, G85E, G542X primers and 3.3 µl ultrapure water.

131 All reactions were performed in a Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers (Applied
132 Biosystems) with the following settings: pre-denaturation 95°C for 15 min followed by 35
133 cycles of 30s at 94°C (denaturation), 1 min 30s at 58°C (annealing), 1 min at 72°C
134 (elongation), and a final extension for 15 min at 72°C. Multiplex PCR products were
135 electrophoresed on 8% mini-polyacrylamide gel (0.75 mm thickness, 8 cm height) (Bio-
136 Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) in 1X TBE at 110 V (constant voltage) for 4 hr at
137 room temperature. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ ml) in 100 ml of 1X
138 TBE for 10 min and photographed with UV transilluminator (Thermo Scientific, USA)
139 (Figure 1).

140 To remove unincorporated nucleotides and excess primers 5 µl of PCR product was
141 cleaned up with 2 µl of ExoSAP-IT (Affymetrix, Inc., Santa Clara, California, USA) for 60
142 min on 37°C followed by enzyme heat inactivation for 20 min on 80°C.

143
144
145
146
147
148
149

CFTR multiplex SNaPshot

150 SNaPshot reaction was performed in 12 µl volume using 5µl of SNaPshot Multiplex
151 Ready Reaction Mix (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 3µL of purified PCR
152 multiplex mix and 0.15 µl of extension primer mix (0.05 µM of each primer) (Table 2).
153 Reactions were performed in a Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems,
154 USA) with the following cycling conditions: 95°C for 5 min followed by 30 cycles of 10 s
155 at 96°C, 5 s at 50°C and 30s at 60°C. The unincorporated ddNTPs were removed from the
156 reaction mix by the use of 1 U shrimp alkaline phosphatase (Affymetrix, Inc., Santa Clara,

157 California, USA) for 37°C for 60 min, followed by enzyme heat inactivation for 20 min on
158 80°C.

159

160 **Capillary electrophoresis**

161

162

163 For capillary electrophoresis 1 µL of purified SNaPshot product was mixed with 9 µl
164 of HiDi™ formamide (Life technologies, Carlsbad, California, USA) and 0.5 µl of
165 GeneScan-120LIZ size standard (Life technologies, Carlsbad, California, USA) and
166 denatured for 5 min at 95°C. The samples were then resolved and detected of capillary
167 electrophoresis on ABI 3130xl genetic analyzer (ABI - Foster City, USA), using POP-4™
168 polymer and 36 cm length capillaries. Thus, the mutations sites could reliably be
169 differentiated among homozygotes wild types, homozygotes mutants or heterozygotes by
170 the incorporated dye-labelled ddNTP.

171

172 To reveal the electrophoresis data, the peak signal was analyzed with GeneMapper
173 software version 4.0 (Applied Biosystems, USA); the dye color of the fragment was used to
174 identify the nucleotide of interest. A representative electropherogram is given in figure 2.
175 For the SNaPshot technique, color was assigned to individual ddNTP as follows: green/A,
176 black/C, blue/G, red/T. The SNaPshot reaction produces one (homozygote) or two
(heterozygotes) peaks depending on the genotype at this locus.

177

178 **Sequence analysis**

179

180

181 A sequence analysis by Sanger sequencing was performed (for the 11 regions of
182 mutations) as another way to confirm the genotypes obtained for the SNaPshot and the
183 commercial test. The amplified fragments were obtained by single PCR using 20 ng of
184 genomic DNA extracted from blood, 20 pmol of each oligonucleotide, 200 mM of

185 deoxyribonucleoside triphosphatase, 2 mM MgSO₄, 1X PCR Buffer minus Mg, and 0.2 U
186 Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a total reaction volume of 30 µl. Cycling
187 parameters were: one cycle of denaturation at 95 °C for 5 min followed by 35 cycles of
188 denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 62 °C for 30 sec, and extension at 72 °C for
189 45 sec. The final extension step was followed by 7 min incubation at 72 °C.

190 Following PCR cycling, unincorporated primers and dNTPs were removed by adding
191 2µl of Affymetrix™ ExoSAP-IT™ to each reaction. The reactions were incubated at 37°C
192 for 30 min, and then inactivated by heating at 80°C for 20 min. The amplification cycling
193 profile was performed in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

194 The PCR products were sequenced in both directions using PCR primers and Big
195 Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City,
196 California, USA) according to the protocol provide by the manufacturer. The reactions were
197 sequenced by the ABI 3130xl DNA sequencing system (Applied Biosystems). The obtained
198 sequences were then compared with the wild type (Wt) controls using Lasergene (DNASTAR,
199 Madison, WI) software.

RESULTS

200

201

202 The quality and concentration of amplified products obtained by multiplex PCR is
203 very important for a great performance in SNaPshot assay. Thereby, were obtained all the
204 amplicons with a good amount of 11 amplified products (Figure 1). The primers used for
205 this multiplex reaction are shown in Table 1.

206

207 After this process, the standardization of SNaPshot reaction was carried. In this step,
208 the 11 most common mutations were detected by single nucleotide extension of primers
209 annealing directly adjacent to the nucleotide of interest. The sizes of SNaPshot primers
210 ranged from 30 to 100 nucleotides. These primers range in 7 nucleotides to facilitate the
211 electrophoretic separation of diagnostic products (Table 2).

211

212 All extension primers multiplexed in one CFTR SNaPshot mix, had electrophoretic
213 mobility and fragment sizes in agreement with any those obtained when each was tested
214 individually without any nonspecific peaks or ambiguous results (Fig. 2).

214

215 Our results showed 100% agreement with the samples tested by the commercial kit
216 Inno-LiPA that had defined genotypes and DNA sequencing into the 11 regions, attesting
217 that the new assay was highly accurate.

217

218 Figure 3 shows two examples of comparisons between the three methods used for
219 mutations analysis, in which the mutation involved were 3120+1G>A (Figure 3.A) and
220 G542X (Figure 3.B). The results show perfectly overlapping data. The result obtained from
221 two different DNA samples in which one genotype was heterozygous for 3120+1G>A
222 mutation is at the top of figure 3, while the other genotype was homozygous for the G542X
223 mutation is shown at the bottom. The SNaPshot window (in the middle) shows the presence
224 of two differently-colored peaks, one coming from the normal allele (blue peak) and the

224 other from the mutated allele (green peak, mutant base A) (Figure 3A). Instead, the result
225 obtained from the other sample shows the presence of only one red peak which represents
226 the mutated allele (mutant base T) (Figure 3B). In the same figure it can also be seen the
227 comparison of both genotypes with sequencing technique as well with the commercial assay.

228 After screening all individuals with CFTR SNaPshot assay, 4 mutations (G542X,
229 W1282X, 3120-1G>A, R334W) were identified and confirmed by commercial genotyping
230 kit Inno-LiPA CFTR19 and Inno-LiPA CFTR17 + Tn and also by sequencing (in forward
231 and reverse direction for the 11 mutations present in SNaPshot panel) for the same mutations.
232 In the set of 34 samples, totaling 68 alleles investigated, 9 mutated alleles (13.2%) have been
233 found. These were distributed as follows: 4/68 (5.9%) carrying G542X mutation, 2/68
234 (2.9%) carrying W1282X mutation, 2/68 (2.9%) carrying 3120-1G>A mutation and 1/68
235 (1.5%) carrying R334W mutation. The remaining 59 alleles (86.8%) did not present any of
236 the investigated mutations (Table 3).

237 The thirty-four samples could be divided into two groups, according to CF suspicion
238 level: a first group with strong CF suspicion 19/34 (55.9%), where samples that had altered
239 IRT tests, altered sweat tests, and those with molecular test for F508del (Wt/ Wt or F508del/
240 Wt). A second group, with weak CF suspicion, 15/34 (44.1%), presenting just one matching
241 criteria or clinical symptom.

242 For the first group, with strong CF suspicion, 8/38 (21.1%) mutated alleles have been
243 found. These were distributed as follows: 4/38 (10.5%) carrying G542X mutation, 2/38
244 (5.2%) carrying 3120-1G>A mutation, 1/38 (2.6%) carrying W1282X mutation, and 1/38
245 (2.6%) carrying R334W mutation (Table 3).

246 For the second group, with weak CF suspicion, 1/30 (3.3%) mutated alleles have
247 been found. These were distributed as follows: 1/30 (3.3%) carrying W1282X mutation
248 (Table 3).

249 The individuals genotypes were established in complement to the F508del
250 information previously available, and they were distributed as follows: 9 (26.5%) were
251 F508del/unknown, 2 (5.9%) were G542X/F508del, 1 (2.9%) was G542X/G542X, 1 (2.9%)
252 was W1282X/F508del, 1 (2.9%) was 3120-1G>A/F508del, 1 (2.9%) was defined 3120-
253 1G>A/unknown, 1 (2.9%) was defined W1282X/unknown and 1 (2.9%) was
254 R334W/F508del. Seventeen (50%) did not carry any of the mutations tested. Table 4
255 presents the results, also divided by the two subgroups of strong suspicion and weak CF
256 suspicion.

257 According to the pattern demonstrated in Figure 2, all genotypes could be confirmed,
258 demonstrating the reliability of this diagnostic procedure. The reproducibility of the
259 SNaPshot analysis was also confirmed by repetitive analysis with subsequent identical
260 results. The overall frequency obtained in three experiments is shown in Table 3.

261

262

DISCUSSION

263

264 In the present study, thirty-four individuals with CF suspicion, previously screened
265 by the Newborn Screening Service of Rio Grande do Sul, have been directed to the extended
266 molecular test (optimized in this study). Eleven mutations (R1162X, G85E, R117H,
267 2789+5G>A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G>A, 3120-1G>A and G551D)

268 have been selected to make up the test, based on previous genetic studies of CF, considering
269 regional aspects and migratory data. This panel was built with the objective of
270 complementing the screening performed by Rio Grande do Sul state, that currently provides
271 only the molecular analysis of F508del mutation, which is the most frequent mutation in CF
272 individuals.

273 The method chosen to accomplish this task was the SNaPshot technique, by its
274 simplicity, after standardized, low cost and high sensitivity, accuracy and reliability ^{16,17}.
275 Data can be easily analyzed by softwares and, thus less susceptible to human mistakes ¹⁸.

276 In comparison with commercial genotyping tests by hybridization, the SNaPshot
277 technique demonstrated to be more sensitive, since it can be made with a lower amount of
278 amplification product. Also, SNaPshot does not require any other equipment than a standard
279 Genetic Analyser, usually available in any genetic laboratory. Another useful feature of
280 SNaPshot is the possibility of simultaneous investigation of different mutations
281 (multiplexing), even if they are located in different regions of the gene ^{19,16}.

282 We have identified 13.2 % of mutant alleles in the total of 68 alleles tested. However,
283 considering only the samples with strong suspicion (altered IRT + altered sweat test + normal
284 or heterozygous for F508del molecular test) this percentage increased to 21.1% of mutant
285 alleles.

286 Four samples showed no hybridization in commercial genotyping tests,
287 demonstrating that these tests may fail to perform the analysis. Especially in these cases, the
288 sequencing carried out was of great importance, because it allowed the confirmation of the
289 genotypes performed by our methodology. These facts corroborate the ability of SNaPshot
290 technique to detect mutations even in low-purity samples ^{16,19}.

291 Comparing the obtained data with reference paper ¹², the frequency of R334W
292 mutation shown in the literature is around 1.3%, close to the value obtained in this study
293 (1.5%). The W1282X mutation, in this study, presented also a frequency of 2.9%, in
294 agreement with literature values of 2.68% and 2.55%, respectively ^{20,21}. For the most severe
295 mutation of class I (G542X) our study obtained an allele frequency of 5.9%, also close to
296 the values indicated in literature, of about 7.65% and 6.25% ^{20,21}. The 3120-1G>A mutation
297 presented a frequency of 2.9%, also in accordance to literature value of around 4% for Minas
298 Gerais state ²². This is the first time that this mutation was identified in RS state. For the
299 other mutations that integrated the panel, there have been no observed cases.

300 Considering the two subgroups (strong suspicion of CF and weak suspicion of CF),
301 it was possible to verify that the group with strong CF suspicion, with two or more criteria
302 altered, exhibited the higher frequency of mutations detected. However, the weak clinical
303 suspects should not be ignored, and low detection of mutations suggests that other mutations
304 may be involved. For these patients, the symptoms may be accompanied, or even, depending
305 on the case, a full analysis of the gene can be performed.

306 The developed panel is complementary tool, an alternative to other methods, and
307 should always be used together with newborn screening service standard tests, with the aim
308 to give more precise information on a particular CF diagnosis.

309 It is important to regionalize these tests, since, for example, the southern Brazilian
310 population has different genetic basis than northern or northeast Brazilian population ⁸.
311 These results are consistent with the European origins of Rio Grande do Sul, colonized
312 mainly by Portuguese, Italian and German populations ⁸.

313 A higher number of screened individuals and a greater set of mutations should be
314 tested, in order to cover the more frequent mutations in our population. The N1303K and
315 711+1G>T are examples, since 2 and 1 alleles were detected respectively, through the
316 commercial genotyping tests used in this study.

317 In conclusion, the implementation of this method in the routine of newborn screening
318 laboratories allows early and personalized diagnosis, directing the patient to a more suitable
319 treatment according to the mutations found. It also allows genetic counseling to the family,
320 a reduction in the frequency of hospitalizations, and, ultimately, an improvement of
321 prognosis and the quality of life of the patient.

322

323

Acknowledgments

324 We would like to thank patients and their families for providing biological material for this
325 study. We would also thank the Serviço de Referência em Triagem Neonatal of Hospital
326 Materno Infantil Presidente Vargas and his entire team for the support provided. This
327 research was supported by Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
328 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS),
329 Secretaria Estadual do Rio Grande do Sul (SES/RS), Departamento de Ciência e Tecnologia
330 da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde
331 (Decit/SCTIE/MS) e do Programa de Iniciação Científica (BIC/UFRGS).

REFERENCES

332

333

- 334 1. O’Sullivan, B. & Freedman, S. Cystic fibrosis. *Lancet* **373**, 1891–1904
- 335 2. Riordan, J. CFTR functional and prospects for therapy. *ANN rev Biochem* **77**, 701–
- 336 726
- 337 3. Zielenski, J. *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane
- 338 conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**, 214–228 (1991).
- 339 4. Vankeerberghen, A., Cuppens, H. & Cassiman, J. The cystic fibrosis
- 340 transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic
- 341 functions. *J Cyst Fibros* L1117–30 (2002).
- 342 5. Maróstica, P., Raskin, S. & Abreu, F. Analysis of the $\Delta F508$ mutation in Brazilian
- 343 cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with
- 344 other patients. *Braz J Med Biol* **31**, 529–532 (1998).
- 345 6. Slavotinek, A. & Biesecker, L. Genetic modifiers in human development and
- 346 malformation syndromes, including chaperone proteins. *Hum Mol Genet* R45–R50
- 347 (2003).
- 348 7. Gallati, S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic
- 349 fibrosis. *Appl. Clin. Genet.* 133–146 (2014).
- 350 8. Faucz, F. R., Souza, D. A. S., Olandoski, M. & Raskin, S. CFTR allelic
- 351 heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications
- 352 for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J. Hum. Genet.* **55**,
- 353 71–6 (2010).

- 354 9. Dal'Maso, V. *et al.* Contribuição da análise molecular do gene regulador da
355 condutância transmembrana na fibrose cística na investigação diagnóstica de
356 pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica. *J Bras Pneumol* **39**,
357 181–189 (2013).
- 358 10. Mishra, A., Greaves, R. & Massie, J. The relevance of sweat testing for the
359 diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin. Biochem. Rev.* **26**, 135–53
360 (2005).
- 361 11. Miller, A. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human
362 nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 537–542 (1988).
- 363 12. Streit, C., Burlamaque-Neto, A. C., de Abreu e Silva, F., Giugliani, R. & Saraiva
364 Pereira, M. L. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol.*
365 *Genet. Metab.* **78**, 259–64 (2003).
- 366 13. Watson, M. S. *et al.* Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of
367 American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet. Med.* **6**, 387–91
- 368 14. Perone, C., Medeiros, G. S., del Castillo, D. M., de Aguiar, M. J. B. & Januário, J.
369 N. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais,
370 Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras.*
371 *Pesqui. médicas e biológicas / Soc. Bras. Biofísica ... [et al.]* **43**, 134–8 (2010).
- 372 15. Sih, T., Godinho, R., Franco, L. P. & Piltcher, O. Cystic Fibrosis: Brazilian ENT
373 Experience. *Int. J. Otolaryngol.* **2012**, 204696 (2012).
- 374 16. Findlay, I., Matthews, P. & Quirk, P. Multiple genetic diagnosis from single cells
375 using multiplex PCR: reliability and allele drop-out. *Prenat. Diagn.* 1413–1421

- 376 (1998).
- 377 17. Krone, N. *et al.* Multiplex Minisequencing of the 21-Hydroxylase Gene as a Rapid
378 Strategy to Confirm Congenital Adrenal Hyperplasia. *Clin. Chem.* **48**, 818–825
379 (2002).
- 380 18. Fiorentino, F. *et al.* The minisequencing method: an alternative strateg for
381 preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol. Hum. Reprod.* **9**,
382 399–410 (2003).
- 383 19. Findlay, I., Ray, P., Quirke, P., Rutherford, A. & Lilford, R. Allelic drop-out and
384 preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for
385 preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum. Reprod.* 1609–1618
386 (1995).
- 387 20. Raskin, S. *et al.* High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-
388 Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet. test* 213–218 (2003).
- 389 21. Faucz, F. *et al.* Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of
390 90% of the alleles. *Clin. Genet* 218–223 (2007).
- 391 22. Perone, C., Medeiros, G., Castillodel, D., Aguiar, M. & Januário, J. Frequency of 8
392 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed
393 by neonatal screening. *Braz J Med Biol* **43**, 134–138 (2010).

394

Table 1. Primers used for multiplex PCR amplification of eleven CFTR regions.

Mutation analyzed ^a	rs	Name	Sequence 5'→3'	Length of PCR fragment amplified in bp	Concentration in mix (nM) ^b
1717-1G>A	76713772	1717-1G>A_FOR 1717-1G>A_REV	CAGCAATGTTGTTTTGACCA CTTGCTCGTTGACCTCCACT	265	240
2789+5G>A	80224560	2789+5G>A_FOR 2789+5G>A_REV	GCATGGGAGGAATAGGTGAA CTGAACTCCTGGGCTCAAGT	340	240
3120+1G>A	75096551	3120+1G>A_FOR 3120+1G>A_REV	TTTGGGTTCTGAATGCGTCT GGCCAGGTAAGCAGTTCTGA	388	160
G85E	75961395	G85E_FOR G85E_REV	GGGATAGAGAGCTGGCTTCA ATTTTGCTGAGCCCATTGAG	334	240
G542X	113993959	G542X_FOR G542X_REV	AGTTCAAATTCAGCCTTGA TTGCTCGTTGACCTCCACTC	152	240
G551D	75527207	G551D_FOR G551D_REV	CAGCAATGTTGTTTTGACCA ACAGCAAATGCTTGCTAGACC	318	400
R117H	78655421	R117H_FOR R117H_REV	CCCCTTTTGTAGGAAGTCACC TAGCTATTCTCATCTGCATTCCA	205	80
R334W	121909011	R334W_FOR R334W_REV	GGAAGGCAGCCTATGTGAGA GTTTGTACAGCCCAGGGAAA	190	160
R553X	74597325	R553X_FOR R553X_REV	GCCTTTCAAATTCAGATTGAGC CTAGCCATAAAACCCAGGA	288	1200
R1162X	74767530	R1162X_FOR R1162X_REV	CGAGAGTTGGCCATTCTTGT CATTGAAAAGCCCGACAAAT	233	160
W1282X	77010898	W1282X_FOR W1282X_REV	TTGGGAAGAACTGGATCAGG CTGGCTAAGTCCTTTGCTCA	169	160

^aLegacy name^bConcentration in the multiplex PCR primer mix adjusted to relatively amounts of amplification products

Table 2. CFTR multiplex SNaPshot primer extension mix with primer orientation and size.

CFTR mutation	Sequence 5'→3'	Orientation	SNaPshot Result (normal/mutant allele)	Primer length (bases)
R1162X	CTGTTGGCATGTCAATGAACCTAAAGACTC	Reverse	G/A	30
G85E	CTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATG	Forward	G/A/T	37
R117H	GGGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAAC	Forward	G/A/C/T	44
2789+5G>A	CCATTCCAGGTGGCTGCTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGGA AAGTGA	Forward	G/A	51
G542X	TTTCTATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACA ATATAGTTCTT	Forward	G/T	58
R334W	TCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAA TCAAAGGAATCATCCTC	Forward	C/T	65
W1282X	GAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTT GGGATTCAATAACTTTGCAACAGTG	Forward	G/A	72
R553X	GTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGG AGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAA	Forward	C/T/G	79
1717-1G>A	ATGATTACATTAGAAGGAAGATGTGCCTTCAAATTCAGATTGAGCATA CTAAAAGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTTGGTAATA	Forward	G/A	86
3120+1G>A	TTGTATATTATAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCAAAGATATAGCAAT TTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAG	Forward	G/A	93
G551D	AGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGC AGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAG	Forward	G/A	100

Table 3. Allelic frequencies of common CF mutations

Mutation			Clinical Suspicion of CF		Strong Clinical Suspicion of CF		Weak Clinical Suspicion of CF	
	Class	Location	N alleles	Frequency (%)	N alleles	Frequency (%)	N alleles	Frequency (%)
R1162X	I	Exon 19	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
G85E	II	Exon 3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
R117H	IV	Exon 4	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2789+5G>A	V	Exon 14b	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
G542X	I	Exon 11	4	5,9%	4	10,5%	0	0,0%
R334W	IV	Exon 7	1	1,5%	1	2,6%	0	0,0%
W1282X	I	Exon 20	2	2,9%	1	2,6%	1	3,3%
R553X	I	Exon 11	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1717-1G>A	I	Intron 11	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
3120+1G>A	I	Intron 16	2	2,9%	2	5,3%	0	0,0%
G551D	III	Exon 11	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
F508del	II	Exon 10	14	20,6%	14	36,8%	0	0,0%
Unknown			45	66,2%	16	42,1%	29	96,7%
Total			68	100%	38	100%	30	100%

Table 4. Genotypic frequencies established in this study

Genotype	Clinical Suspicion of CF		Strong Clinical Suspicion of CF		Weak Clinical Suspicion of CF	
	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)	N	Frequency (%)
G542X / G542X	1	2,9%	1	5,3%	0	0,0%
G542X / F508del	2	5,9%	2	10,5%	0	0,0%
W1282X / F508del	1	2,9%	1	5,3%	0	0,0%
3120-1G>A / F508del	1	2,9%	1	5,3%	0	0,0%
3120-1G>A / unknow	1	2,9%	1	5,3%	0	0,0%
W1282X / unkwnown	1	2,9%	0	0,0%	1	6,7%
R334W / F508del	1	2,9%	1	5,3%	0	0,0%
F508del / unknown	9	26,5%	9	47,4%	0	0,0%
unknown / unknown	17	50,0%	3	15,8%	14	93,3%
Total	34	100%	19	100%	15	100%

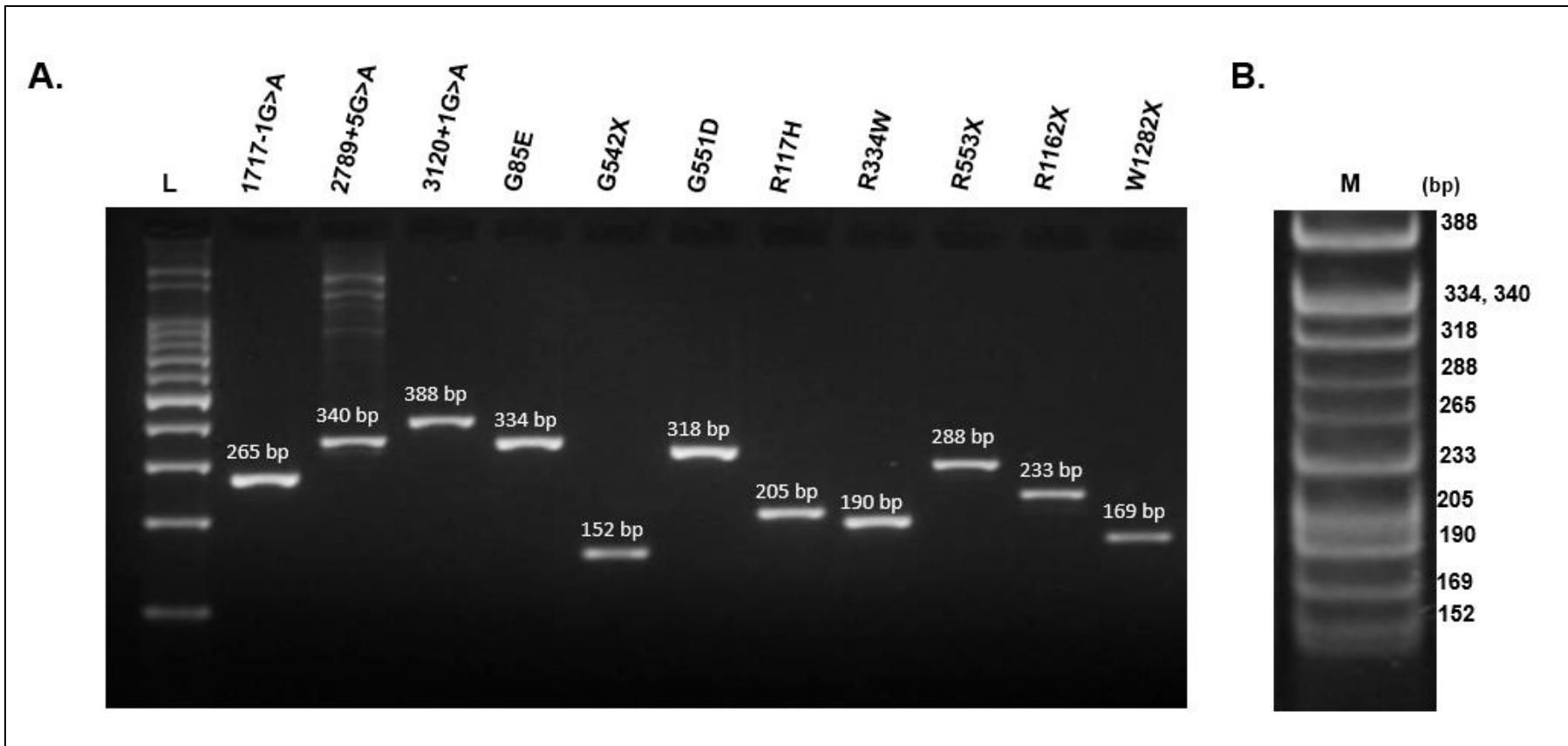


Fig.1. Amplification of regions of the *CFTR* gene under study. A) Analysis of the PCR products of the 11 regions studied in 3% agarose gel electrophoresis (120 volts for 2 hr) to confirm the efficiency of the primers. B) Analysis of standardized multiplex PCR products in 8% polyacrylamide gel electrophoresis (110 volts for 4 hr). L= DNA ladder 100 bp, M= Multiplex PCR product

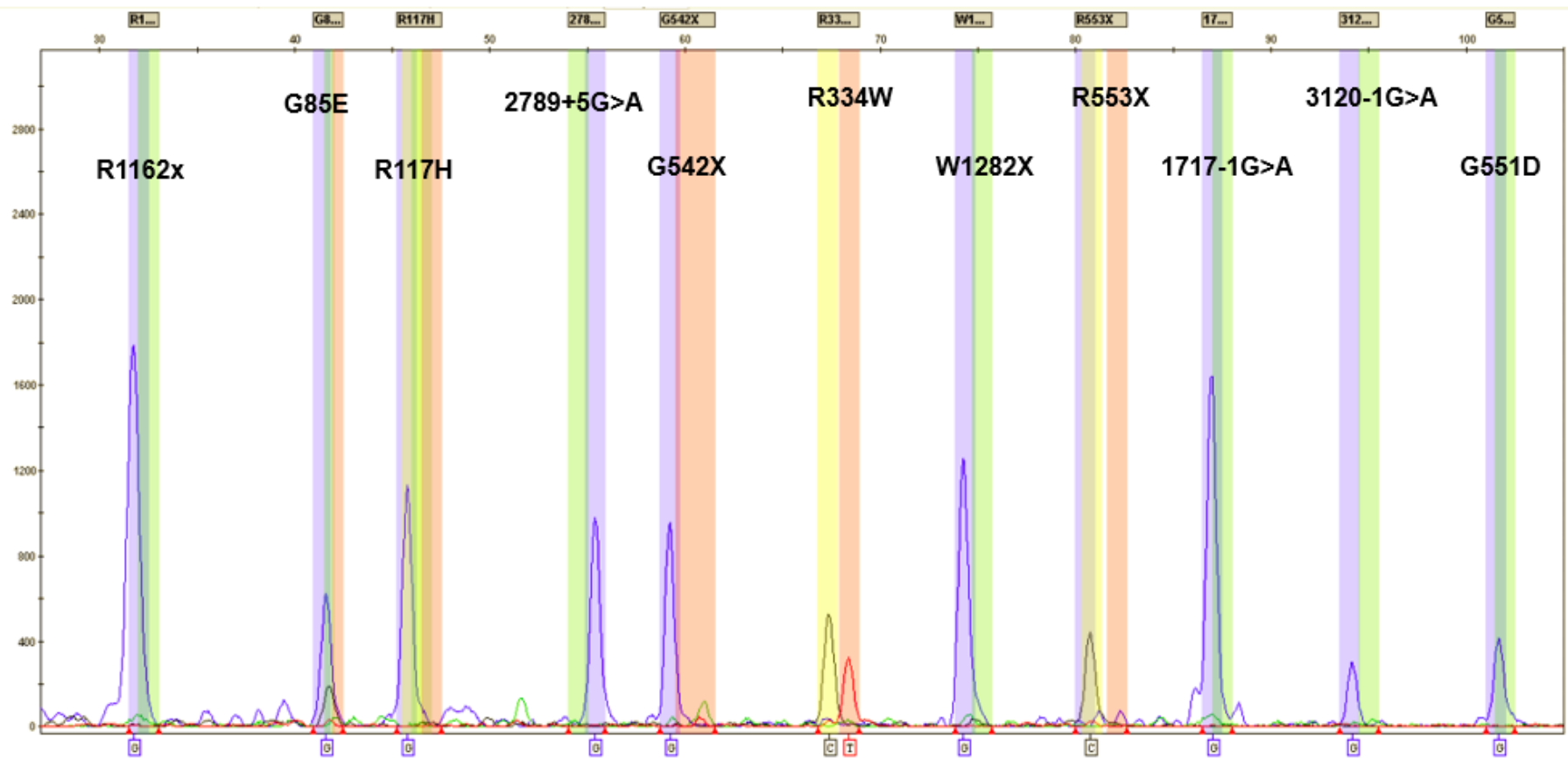


Fig. 2. Representative electropherograms of CFTR SNaPshot assay. Electropherograms of SNaPshot for detection of 11 CFTR mutations in one sample along with GeneScan™120 LIZ™ size standard.

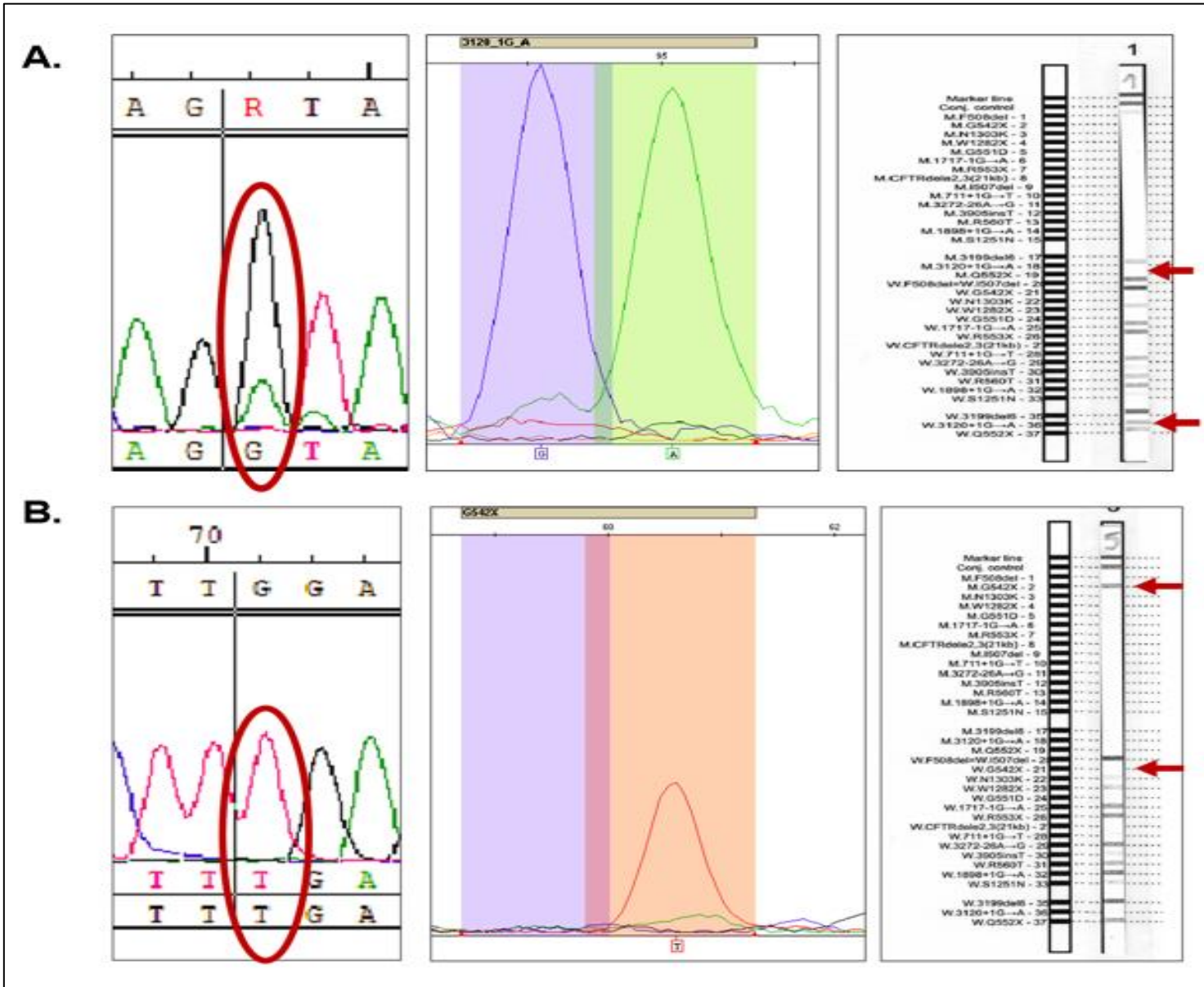


Fig. 3. Comparison and confirmation of the results obtained by SNaPshot with commercial genotyping assay and sequencing. A) Detection of 3120-1G>A mutation (heterozygote). On the left, the figure shows a peak for both SNP T/A. The same can be seen in the middle (the SNaPshot). On the right, the figure shows the result of hybridization on the strip in the wild-type allele (W.3120-1G> A) as the mutant allele (M.3120-1G> A) B) Detection of G542X mutation (homozygote). On the left, the figure shows just one peak for SNP T. The same can be seen in the middle (the SNaPshot). On the right, the figure shows the result of hybridization on the strip in mutant allele (M.3120-1G> A) and no hybridization on wild-type allele.

5. Manuscrito 2: “Determination of the F508del mutation in deceased patients who were under investigation for Cystic fibrosis”

ARTIGO

Os resultados do presente trabalho serão apresentados na forma de manuscrito que será submetido à publicação na revista *Journal of Cystic Fibrosis*.

Short Communication

Determination of the F508del mutation in deceased patients who were under investigation for cystic fibrosis

Thaiane Rispoli Serrano^{a,b,*}, Natalie Miorando Gonçalves^d, Cláudia Maria Dornelles da Silva^b,
Tarciana Grandi^b, Letícia Filippin^c, Gilberto Bueno Fischer^c, Maria Lucia Rosa Rossetti^{a,b} &
Simone Martins de Castro^{c,d}

^aCentro de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^bCentro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CDCT, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde -FEPPS, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cServiço de Referência em Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas -SRTN/HMIPV, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^dFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: (+55) 51 3352.0336

*E-mail address: thianerispoli@gmail.com

Keywords: F508del, mutation, deceased patients, cystic fibrosis, newborn screening

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Abstract

Objectives: Determining the F508del mutation in patients under investigation for cystic fibrosis, screened by newborn screening, who died during this investigation and standardize a technique for DNA extraction from dry blood samples fixed on filter paper.

Methods: DNA was extracted from blood samples fixed on filter paper (S&S 903) of 93 newborns with abnormal levels of immunoreactive trypsin (IRT). The amplification in exon 10 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene was performed by polymerase chain reaction (PCR), and the definition of sizes of fluorescent DNA fragments was performed by automated analyzer.

Results: Of the 93 patients with altered IRT analyzed, two heterozygous individuals for F508del mutation have been detected.

Conclusion: Altered IRT levels are not a sufficient condition for CF diagnosis. The standardization of DNA extraction from dried blood spot was successful, allowed the detection of F508del mutation in the *CFTR* gene, and the technique can be extended to cover other mutations and other genetic diseases.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is considered the most common lethal congenital disease in Euro-descendant populations. It is an autosomal recessive genetic disease with an estimated incidence in Brazil of 1 in 7,500 live births, with variations in different states [1]. CF is the result of mutations in a gene located on the long arm of chromosome 7 (locus 7q31) [2], responsible for encoding a regulatory protein called cystic fibrosis transmembrane

25 conductance regulator (CFTR), which functions as a channel of ions and water into the apical
26 membrane of epithelial cells [3,4]. Mutations in the gene can cause alterations in the exocrine
27 glands cells of the respiratory, gastrointestinal, reproductive and sweat glands systems,
28 which may lead the patient to death [5,6]. About 2,006 mutations have already been
29 described in the *CFTR* gene, and the F508del is the most frequent in patients with CF
30 [CFTR1 database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>]. The newborn screening test
31 for CF measures the immunoreactive trypsin (IRT) levels, which are elevated in infants with
32 CF, followed by analysis of sodium and chloride levels in sweat (sweat test). It is also
33 performed the genotyping of newborns who presented increased levels of IRT and altered
34 sweat tests in order to identify at least the F508del mutation. Newborn screening comprises
35 a set of laboratory tests applied to newborns to identify various diseases, including CF.
36 However, in some cases, death occurs in any of these phases, making the investigation
37 incomplete (**Figure 1**). This study determined the F508del mutation in dried blood samples
38 (DBS) of patients who died under investigation of CF in the Newborn Screening Reference
39 Service of the Rio Grande do Sul State, southern Brazil.

40

41 **Methods**

42

43 Ninety three babies screened in the Reference Newborn Screening Service of RS and in
44 deceased under CF investigation were analyzed, from May 2012 to June 2015. The patients
45 presented IRT levels greater than 70 ng/mL using a first-tier IRT screen in the first or second
46 sample.

47 The genetic material extraction from filter paper S&S 903 was done by magnetic separation
48 with modified protocol, using the DNA IQ System™ kit (Promega). Four bloodspots of 1.2

49 mm of diameter have been standardized for the analysis. Samples were treated with 150 μ L
50 of DNA IQ kit lysis buffer and then were heated at 70°C for 30 minutes. Along with the
51 buffer, the samples were removed for DNA IQ Spin Basket seated in a ClickFit microtube
52 at room temperature and centrifuged for 3 minutes at maximum speed. Subsequently, the
53 steps lysis, magnetic separation and washing were performed according to the
54 manufacturer's protocol. The samples were dried at room temperature for 10 minutes, eluted
55 in 30 μ L of Elution buffer, vortexed for 2 seconds and heated at 65° C for 5 minutes. After
56 further separation, the solution containing the DNA from each sample was transferred to a
57 new tube stock at -4°C. From the extracted DNA, PCR was performed for DNA
58 amplification of exon 10 of the CFTR gene. The gene identification was performed using
59 the primers [GTTTTCTGGATTATGCCTGGCAC (forward) and
60 GTTGGCATGCTTTGATGAC GCTTC (reverse)] [7] that amplify a specific sequence of
61 98 bp where the F508del mutation occurs. The reactions were performed in a volume of 50
62 μ L with 2 μ L DNA (approximately 0.3 ng/ μ L), 0.25 μ L of each primer (20 pmol/ μ L), 1.25
63 U of Platinum Taq, 2500 μ M of phosphate deoxyribonucleotides (dATP, dTTP, dCTP,
64 dGTP each), 5 μ l of 10x buffer, 2 μ L of MgCl₂ and 38.25 μ L of ultra pure water. The
65 amplification reaction conditions were: 95° C for 5 minutes; followed by 27 cycles of 95° C
66 for 30s, 62° C for 30s and 72° C for 30s; and a final extension of 7 min at 72° C. The PCR
67 products were analyzed by capillary electrophoresis on ABI Genetic Analyzer 3130xl
68 (Applied Biosystems, Inc.) for the identification of the alleles. 1 μ L of the amplified product
69 was added to 9 μ L of formamide HiDi (Life Technologies) and combined with 1 μ L of the
70 size standard GeneScan LiZ120 (Life Technologies), denatured at 95° C for 5 minutes and
71 immediately placed on ice for 2 minutes.

72

Results

73

74

75 At different times of occurrence of death during the screening for CF, a total of 93 patients
76 were analyzed. The data of the patients and their distribution in the Rio Grande do Sul state
77 are shown in (**Figure 2**). The results of molecular analysis showed the presence of two
78 heterozygous individuals WT/F508del (**Figure 3**) with IRT dosage of 71.4 and 95.3 ng/mL,
79 respectively, that died before the second IRT analysis.

80

Discussion

81

82

83 The Newborn Screening comprises a set of laboratory tests applied to newborns to identify
84 several diseases, even in the asymptomatic phase. It is aimed at reducing child mortality
85 through early detection of some diseases, including cystic fibrosis, allowing the adoption of
86 preventive actions. The newborn screening for CF is done by measuring the immunoreactive
87 trypsin (IRT) levels, which is elevated in infants with CF, followed by analysis of sodium
88 and chloride levels in sweat (sweat test), and a posterior genotyping test. The accuracy of
89 the newborn screening is enhanced by combining the genotyping on those infants that have
90 altered IRT levels and sweat test, in order to identify at least the most common mutation,
91 F508del. However, in some cases, death occurred in any of these phases, making the
92 investigation incomplete (Fig 1). For this reason, standardization of molecular studies on
93 filter paper (S&S 903) has facilitated the complementation of the investigation in children
94 who had died due to its interrupted studies. It is known that F508del is the most common
95 mutation in CF patients. In Europe, on average, 70% [8] of patients with CF has F508del

96 mutation. Previous studies from our group showed that in Rio Grande do Sul state this rate
97 is 61,3% [9]. Analyzing the geographical distribution of deaths, it can be inferred that most
98 of the individuals who had IRT altered in this study coincide with the areas of German,
99 Italian and Azorean immigration, according to the history of European colonization in the
100 RS [10]. Parents who both carry the mutation have a 25% chance of having an affected child.
101 In this study, we investigated the F508del mutation in patients screened by the Reference
102 Laboratory in Newborn Screening of the Rio Grande do Sul state under cystic fibrosis
103 investigation, and who died before performing the sweat test. It was found that 2.15% of
104 patients with IRT greater than 70 ng/mL had at least one allele with the F508del mutation
105 (Figure 3). Although there are indications that the CF exist for a long time, probably this
106 disease was not recognized, being confused with many other conditions that simulate its
107 manifestations, such that pneumonia, bronchiectasis, asthma, malnutrition and celiac disease
108 [11]. Frequently physicians contend, on the death certificate, the complication and not the
109 main cause of death, so the mortality statistics by causes are compromised as to its quality.
110 The standardization on DNA extraction from dry blood was successful for F508del mutation
111 on *CFTR* gene, and the technique can be extended to cover other mutations and other genetic
112 diseases. Molecular studies help to elucidate the cause of death in newborns, not only due to
113 CF, but molecular tests may include other genetic diseases, which can be helpful for further
114 investigation in certain cases.

115

Acknowledgment

116

117

118 This work was supported by Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
119 (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS),
120 Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES/RS), Fundação Estadual de
121 Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Departamento de Ciência e Tecnologia da
122 Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde
123 (Decit/SCTIE/MS) and Programa de Iniciação Científica BIC/UFRGS.

References

124

125

126 [1] Marostica, P.J. **Dornase alpha use in patients with cystic fibrosis.** *Rev paul pediatr.*
127 2013;31:418-419.

128 [2] Rizzo, L.C., Fischer, G.B., Marostica, P.J., Mocelin, H.T. **Profile of cystic fibrosis in**
129 **two reference centers in southern Brazil.** *Rev Assoc Med Bras.* 2015;61:150-155.

130 [3] Kerem, B.S., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.C., Chakravati,
131 A. *et al.* **Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.** *Science.*
132 1989;245:1073-1080.

133 [4] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z. *et*
134 *al.* **Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of**
135 **complementary DNA.** *Science.* 1989;245:1066-1073.

136 [5] Pereira, M.L., Kiehl, M.F., Sanseverino, M.T. **Genetics of cystic fibrosis.** *Rev HCPA.*
137 2011;31:160-167.

138 [6] Kulczycki, L.L., Kostuch, M., Bellanti, J.A. **A clinical perspective of cystic fibrosis**
139 **and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype**
140 **manifestations.** *Am J Med Genet A.* 2003;116:262-267.

141 [7] Araújo, F.G., Novaes, F.C., Santos N.P., Martins V.C., Souza S.M, Santos S.E. *et al.*
142 **Prevalence of $\Delta F508$, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis**
143 **patients in the North of Brazil.** *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:5-11.

- 144 [8] Marson, F.A., Bertuzzo, C.S., Ribeiro, M.A., Ribeiro, A.F., Ribeiro, J.D. **Pesquisa da**
145 **mutação F508del como primeiro passo no diagnóstico molecular de fibrose cística.** *J*
146 *bras pneumol.* 2013;39:306-316.
- 147 [9] Castro, S, Rispoli, T, Dornelles, C, Chapper, M, Fischer, G, Malerba, H, Fillipon, L.
148 **Study of Three Years on Newborn Screening for Cystic Fibrosis in the Public Health**
149 **System in Southern Brazil.** *J Inborn Erros of Metabolismo and Screening.* 2015;3:44-45.
- 150 [10] Gass, S.L., Verdum, R., Mantelli, J. **Estrutura, processo, função e forma no setor**
151 **agrário do noroeste do Rio Grande do Sul.** *Confins.* 2014;20.
- 152 [11] Firmida, M.C., Lopes, A.J. **Aspectos epidemiológicos da fibrose cística.** *Rev Hosp*
153 *Univ Pedr Ernest.* 2011; 10:12-22.

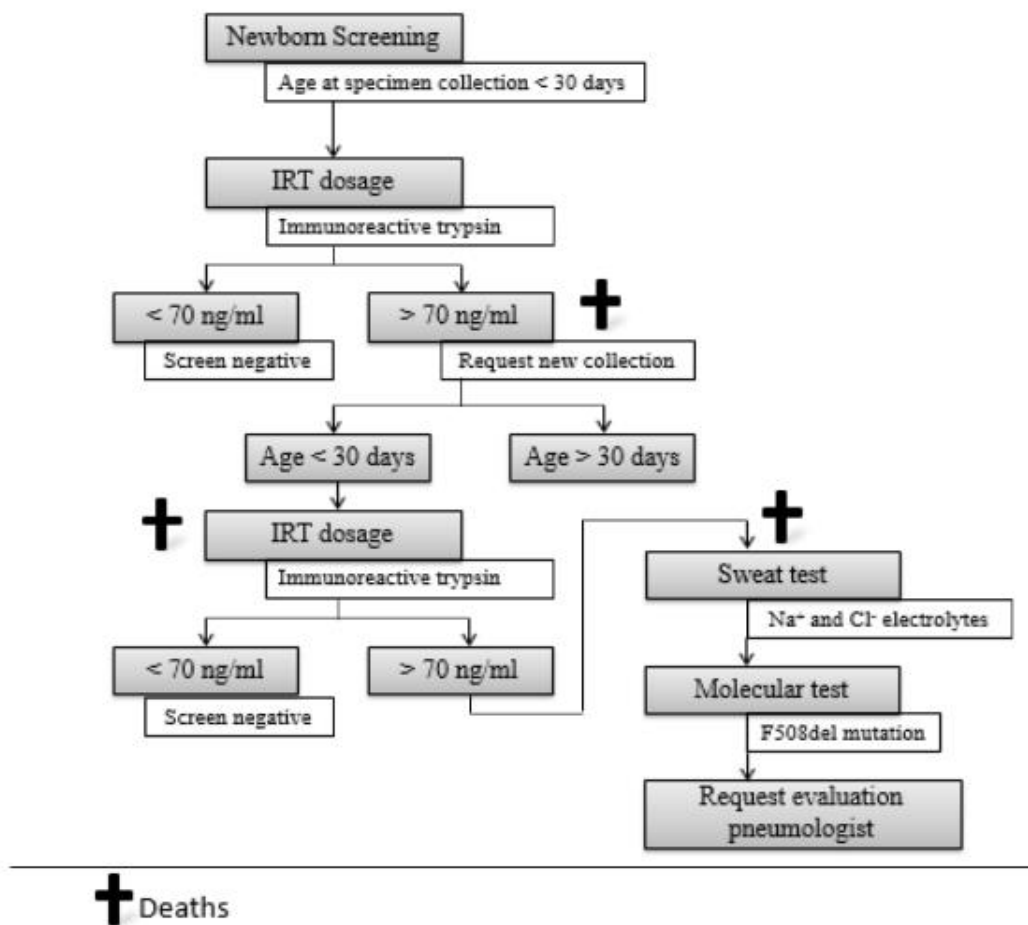


Figure 1. CF testing algorithms of the Newborn Screening Reference Service in the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil.

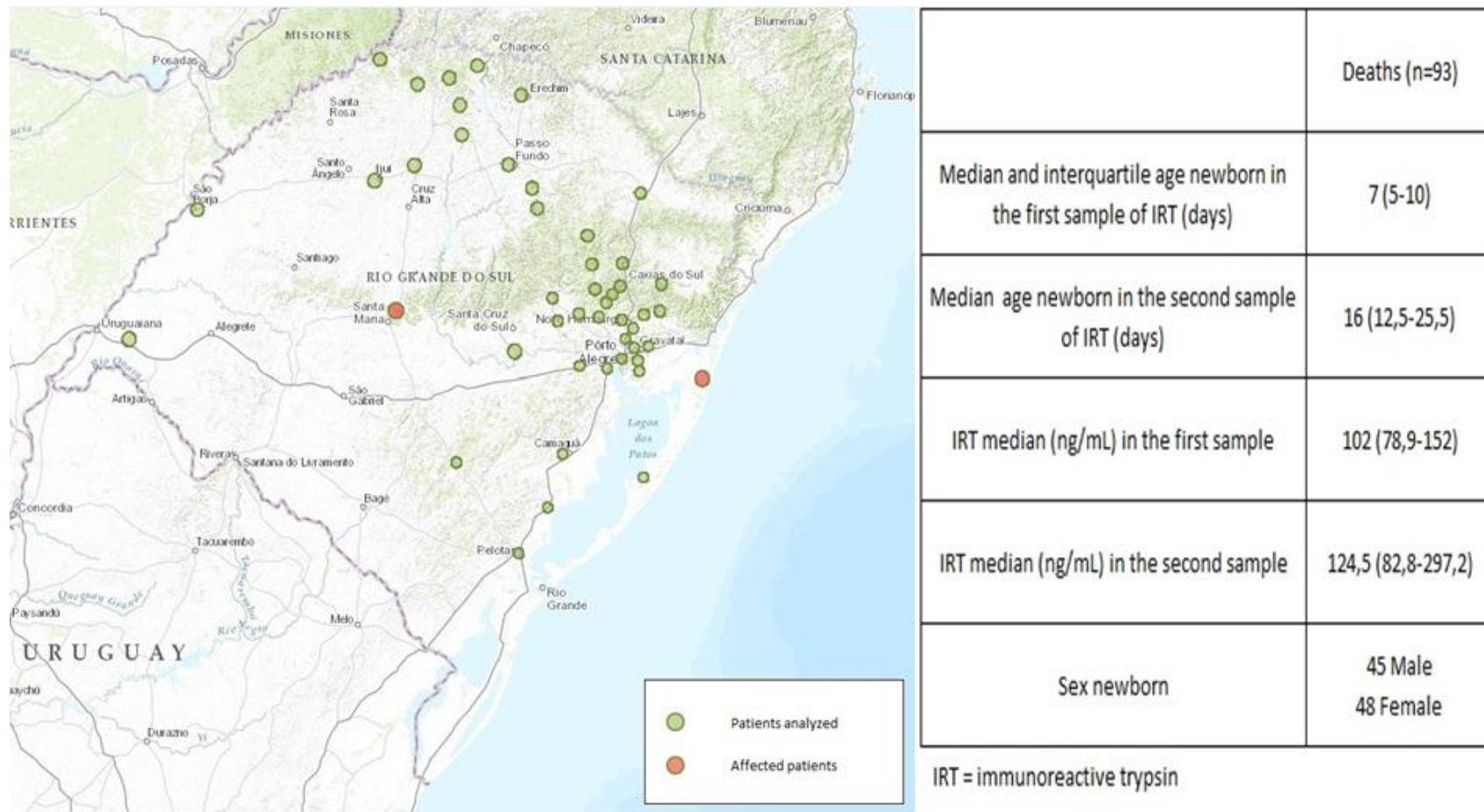


Figure 2. Patients data and their distribution in the Rio Grande do Sul state.

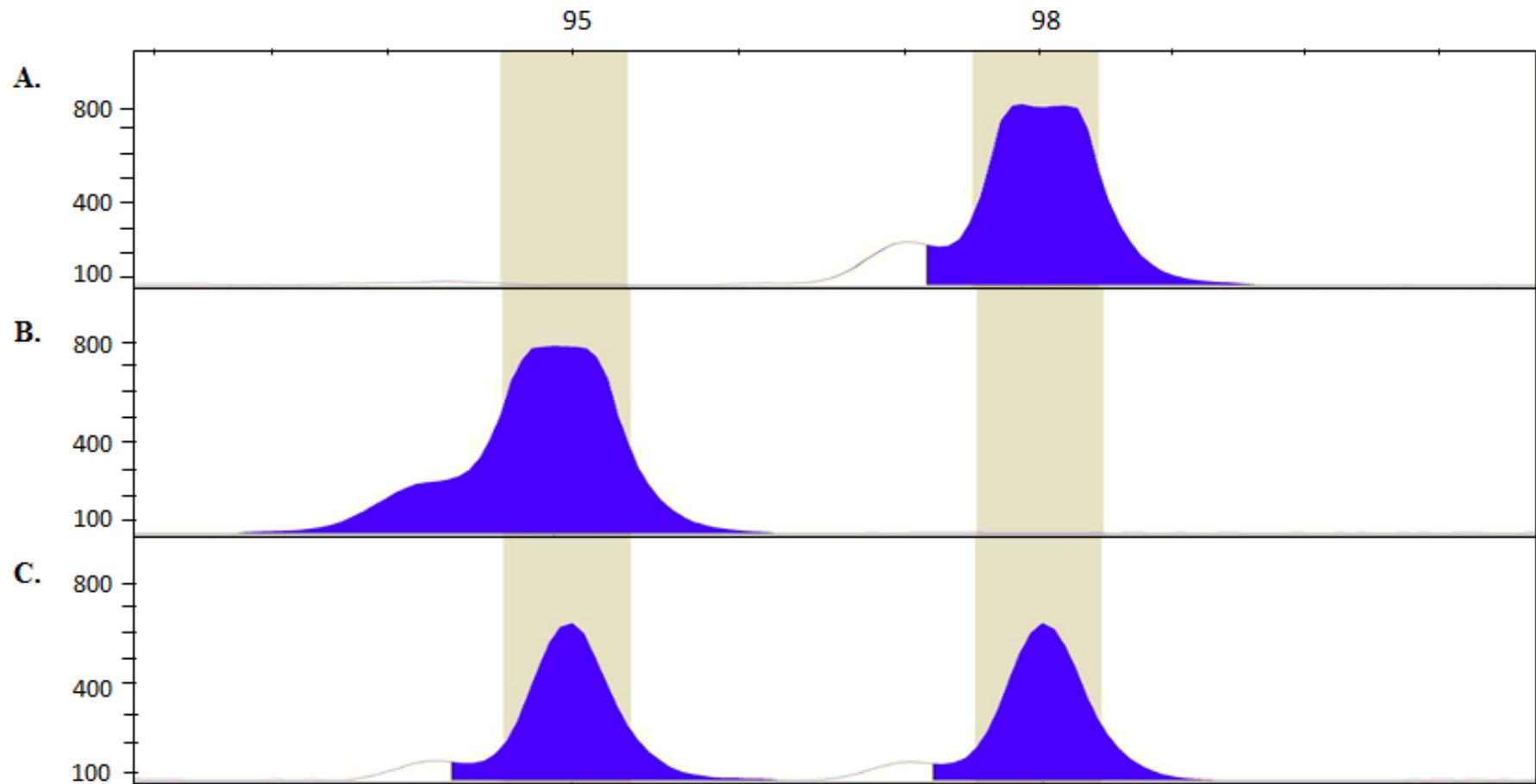


Figure 3. The electropherogram showing **A.** Wild type homozygous individuals control (WT/WT) **B.** F508del homozygous individuals control (F508del/ F508del) **C.** Heterozygous individuals (WT/F508del). Analyzed on the ABI PRISM 3130XL.

6. DISCUSSÃO GERAL

A fibrose cística é a doença genética de caráter autossômico recessivo mais comum em populações euro-descendentes. Sua incidência no mundo é de um a cada 2.500 nascidos vivos. Aproximadamente 2.000 mutações já foram descritas para esta proteína, sendo a mais prevalente a mutação F508del. Estas mutações causam disfunções na proteína CFTR que regula as passagens de cloro e de sódio através da membrana celular, conduzindo a diferentes graus de manifestações clínicas.

Atualmente esta doença é rastreada durante a triagem neonatal. O rastreamento neonatal para FC tem utilizado o teste da dosagem da tripsina imunorreativa (IRT) que se encontra elevada em recém-nascidos com FC, seguido da análise de níveis de sódio e de cloro no suor (teste do suor). A acuidade do rastreamento neonatal é aumentada, combinando-se a este a genotipagem naqueles recém-nascidos que apresentam o IRT e suor alterados, de maneira a identificar pelo menos a mutação mais comum, a F508del. No entanto, em alguns casos, o óbito ocorre em alguma dessas fases, tornando a investigação incompleta.

No presente estudo, tivemos como objetivo geral a identificação de mutações em pacientes com suspeita de FC triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do estado do Rio Grande do Sul. Dois estudos foram realizados.

No primeiro estudo, foi otimizado o método de extensão de base única (SNaPshot) para detecção de mutações no gene CFTR. Onze mutações (R1162X, G85E, R117H, 2789+5G>A, G542X, R334W, W1282X, R553X, 1717-1G>A, 3120-

1G>A e G551D) foram selecionadas para compor o teste, baseadas em estudos prévios de FC, considerando as regionalidades e dados migratórios de populações. Este painel foi montado com o objetivo de complementar a triagem realizada pelo estado do RS que atualmente faz apenas a análise molecular da mutação F508del.

O método escolhido para implementar a detecção de 11 mutações no gene *CFTR*, foi a técnica de extensão de base única (SNaPshot), pela sua simplicidade, baixo custo, alta sensibilidade, precisão e confiabilidade. Os dados podem ser facilmente analisados por softwares, sendo assim, menos susceptível a erros humanos.

Em comparação com os testes de genotipagem comerciais por hibridização, a técnica de SNaPshot se mostrou mais sensível, podendo ser feita com uma quantidade inferior de produto de amplificação. Além disso, o SNaPshot não requer qualquer outro equipamento além de um analisador genético padrão, que é usualmente disponível em laboratórios de genética. Outro recurso útil do SNaPshot é a possibilidade de investigação simultânea (multiplex) de diferentes mutações, mesmo estando em diferentes regiões do gene.

Nós identificamos 13,2% alelos mutantes no total de 68 alelos testados. Entretanto, considerando somente as amostras com grande suspeita (IRT alterado + teste do suor alterado + teste molecular normal ou heterozigoto para F508del) essa taxa aumentou para 21,1% dos mutantes alelos.

Quatro amostras não apresentaram hibridização nos testes de genotipagem comercial, mostrando que esta técnica não apresenta alta sensibilidade. Especialmente nestes casos, o sequenciamento realizado teve grande importância,

pois permitiu a confirmação dos genótipos analisados pela nossa metodologia. Esses fatos corroboram a capacidade que o SNaPshot apresenta de detectar mutações, mesmo em amostras com baixo grau de pureza.

Comparando os dados obtidos com artigos de referência (Streit *et al.*, 2003), a frequência da mutação R334W indicada na literatura situa-se em torno de 1,3%, valor próximo ao valor obtido neste estudo (1,5 %). A detecção da mutação W1282X, neste estudo, apresentou uma frequência de 2,9 %, concordando com os valores 2,68% e 2,55%, respectivamente nas referências (Raskin *et al.*, 2003; Faucz *et al.*, 2007). Para a mutação mais grave de classe I (G542X) nosso estudo mostrou uma frequência de 5,9 % dos alelos, também próximo a valores indicados na literatura, de cerca de 7,65% e 6,25% (Raskin *et al.*, 2003; Faucz *et al.*, 2007). A mutação 3120-1G>A apareceu com uma frequência de 2,9 %, valor próximo a frequência do estado de Minas gerais (4%) (Perone *et al.*, 2010). Em trabalhos anteriores da nossa região (Streit *et al.*, 2003; Faucz *et al.*, 2010), esta mutação não tinha sido identificada ainda.

Para as demais mutações que compunham o painel, não foram detectados casos.

Considerando os dois subgrupos estudados no primeiro artigo, foi possível ver que o grupo com forte suspeita de FC, com dois ou mais critérios alterados, apresentou a maior frequência de mutações detectadas. No entanto, as baixas suspeitas clínicas não devem ser descartadas e a baixa detecção de mutações sugere que outras mutações possam estar envolvidas. Para estes pacientes, os sintomas

devem ser acompanhados, ou até mesmo, dependendo do caso, uma análise completa do gene pode ser efetuada.

O painel desenvolvido é uma ferramenta complementar, uma alternativa a outros métodos, e deve sempre ser usado em conjunto com testes padrão de triagem neonatal, com o objetivo de dar uma informação mais precisa sobre o diagnóstico de FC.

A regionalização destes painéis é importante, uma vez que, por exemplo, a população do sul do Brasil tem base genética diferente da população do Norte ou do Nordeste brasileiro (Morrall *et al.*, 1994; Lopez-Camelo *et al.*, 1996).

Um número maior de indivíduos triados e uma maior gama de mutações testadas serão necessárias, de forma a cobrir as mutações mais frequentes na nossa população. As mutações N1303K e 711+1G>T são exemplos, pois foram detectados 2 e 1 alelos, respectivamente, nos testes de genotipagem comercial utilizados neste estudo.

No segundo estudo desenvolvido, a frequência da mutação F508del foi avaliada em recém-nascidos que apresentavam suspeita de fibrose cística e que morreram durante a triagem neonatal, além de realizada a padronização da técnica de extração de DNA seco em papel filtro S&S 903 - sendo este o único material genético disponível do indivíduo. A análise de fragmento revelou que 2,15% dos óbitos triados, com dosagem de IRT maior que 70 ng/mL, apresentaram heterozigose para a mutação F508del.

Finalizando, a implementação do SNaPshot proposto na rotina de laboratórios de triagem neonatal possibilita ao paciente um diagnóstico precoce,

um tratamento mais direcionado, conforme as mutações encontradas, uma redução da frequência de hospitalização e um aumento do prognóstico e da qualidade de vida. A técnica de extração de DNA e a detecção da mutação F508del no gene *CFTR*, a partir de sangue seco em papel filtro, pode ser estendida para a detecção de outras mutações e de outras doenças. Estudos moleculares ajudam a elucidar as causas de morte de recém-nascidos, não apenas devido a FC, mas também devido a outras doenças genéticas, o que pode ser útil para investigações mais detalhadas em certos casos.

7. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho, podemos concluir que:

- ✓ A metodologia de SNaPshot mostrou-se eficiente para a detecção de mutações no gene CFTR;
- ✓ As mutações G542X, R334W, W1282X e 3120-1G>A foram identificadas na população de estudo pela metodologia proposta;
- ✓ As mutações G542X, R334W, W1282X e 3120-1G>A apresentaram as frequências 5,9%, 1,5%, 2,9% e 2,9%, respectivamente;
- ✓ A forte suspeita clínica de FC (a presença de mais de um critério) aumenta a taxa de identificação da presença de mutações no gene CFTR;
- ✓ A maior parte das mutações foram encontradas em pacientes com forte suspeita de FC. As frequências das mutações foram G542X (10,5%), R334W (2,6%), W1282X (2,6%) e 3120-1G>A (5,2%). Em pacientes com baixa suspeita de FC, foi encontrada apenas a mutação W1282X, com frequência de (3,3%);
- ✓ Foi possível padronizar com sucesso a extração de DNA a partir de amostra de sangue seco em papel filtro S&S 903. A frequência encontrada da mutação F508del em pacientes com suspeita de FC que foram à óbito foi de 2,15%.

8. REFERÊNCIAS

- Ahmed, N., 2003. Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut*, 52(8), pp.1159–1164.
- Amaral, M. & Kunzelmann, K., 2007. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci.*, 28(7), pp.334–341.
- Andersen DH., 1938. No Title Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease - A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*, pp.56:341–99.
- Anderson, M.P. *et al.*, 1991. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, 67(4), pp.775–784.
- Becq, F. *et al.*, 2011. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J. Cyst. Fibros.*, 10(Suppl 2), pp.S129–S145.
- Belcher, C. & Vij, N., 2010. Protein processing and Inflammatory Signaling in Cystic Fibrosis. *Current Molecular Medicine*, (10), pp.82–94.
- Boeck, K. *et al.*, 2006. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*, (19), pp.575–606.
- Boucher, R., 2012. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir*, (40), pp.1390–1400.
- Butler, J., 2011. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. *Academic Press*.
- Castellani, C. & Massie, J., 2010. Emerging issues in cystic fibrosis newborn

- screening. *Curr Opin Pulm Med*, 16(6), p.166.
- Chan, H., Ruan, Y. & He, Q., 2009. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol*, (587), pp.2187–2195.
- Chmiel, J. *et al.*, 1999. Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. *Pediatrics*, (103), pp.823–6.
- Culling, B. & Ogle, R., 2010. Genetic Counselling Issues in Cystic Fibrosis. *Pediatr Respir Rev*, (1214), pp.57–69.
- Cutting GR., 2005. Modifier genetics: cystic fibrosis. 2005;6:237–60. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6, pp.237–60.
- Dal’Maso, V. *et al.*, 2013. Contribuição da análise molecular do gene regulador da condutância transmembrana na fibrose cística na investigação diagnóstica de pacientes com suspeita de fibrose cística leve ou doença atípica. *J Bras Pneumol*, 39(2), pp.181–189.
- Dalcin, P. & Abreu e Silva, F., 2008. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *J Bras Pneumol*, (34(2)), pp.107–117.
- Dalemans, W. *et al.*, 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*, 354(6354), pp.526–8.
- Davis, P., 2001. Cystic fibrosis. *Pediatric Rev*, (22), pp.257–64.
- Derichs, N., Jin, B. & Song, Y., 2011. Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. *FASEB*, (25), pp.2325–2332.

- Drumm, M. *et al.*, 1991. Chloride conductance expressed by deltaF508 and other mutant CFTRs in *Xenopus oocytes*. *Science*, (254), pp.1797–9.
- Dupuis, A. *et al.*, 2015. Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*.
- Engelhardt, J., Yankaskas, J. & Ernst, S., 1992. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet*, (2), pp.240–248.
- Faria, E. *et al.*, 2014. Associação entre deficiência de alfa-1-antitripsina e a gravidade da fibrose cística. *Pediatrics*, 81(6), pp.485–90.
- Farmen, S. *et al.*, 2005. Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl⁻ transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(6), pp.L1123–L1130.
- Farrel, P. & Kosciuk, R., 1999. Sweat chloride concentration in infants homozygous or heterozygous for F508 cystic fibrosis. *Pediatrics*, (97), pp.524–8.
- Faucz, F. *et al.*, 2007. Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin. Genet*, (72), pp.218–223.
- Faucz, F.R. *et al.*, 2010. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *Journal of human genetics*, 55(2), pp.71–6.

- Findlay, I. *et al.*, 1995. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum. Reprod.*, (10), pp.1609–1618.
- Findlay, I., Matthews, P. & Quirk, P., 1998. Multiple genetic diagnosis from single cells using multiplex PCR: reliability and allele drop-out. *Prenat. Diagn.*, (18), pp.1413–1421.
- Fiorentino, F. *et al.*, 2003. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Molecular Human Reproduction*, 9(7), pp.399–410.
- Flume, P. & Van Devanter, D., 2012. State of progress in treating cystic fibrosis respiratory disease. *BMC medicine*, (22), pp.212–225.
- Frizzell, R., 1999. Ten years with CFTR. *Physiol Rev*, (79), pp.S1–2.
- Frossard, P. *et al.*, 1999. Determination of the prevalence of cystic fibrosis in the United Arab Emirates by genetic carrier screening. *Clinical genetics*, (55), pp.496–497.
- Frossard, P. *et al.*, 1998. Identification of cystic fibrosis mutations in the United Arab Emirates. *Hum Mutant*, (1), pp.412–413.
- Gadsby, D., Vergani, P. & Csányi, L., 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature rev*, (440), pp.477–483.
- Gallati, S., 2014. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *The Application of Clinical Genetics*, (7), pp.133–146.
- Gesteira, R., 1949. Fibrose cística no pâncreas-incidência no Brasil. *Bol Inst Pueric*,

(12/13), pp.23–62.

Gibson, L. & Cooke, R., 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, (23), pp.545–99.

Gibson-Corley, K.N., Meyerholz, D.K. & Engelhardt, J.F., 2016. Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis. *The Journal of pathology*, 238(2), pp.311–20.

Goralski, J., Boucher, R. & Button, B., 2004. Osmolytes and ion transport modulators: new strategies for airway surface rehydration. *Curr Opin Pharmacol*, (23), pp.294–299.

Gray, M. *et al.*, 1995. Chloride channels and cystic fibrosis of the pancreas. *Biosci Rep*, (15), pp.531–41.

Grebbe, T. *et al.*, 1994. Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am J Genet*, (54), pp.443–446.

Guggino, W. & Stanton, B., 2006. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (7), pp.426–436.

Hardy, J. *et al.*, 1973. Sweat tests in the newborn period. *Arch Dis Child*, (48), pp.316–8.

Hergersberg M *et al.*, 1997. A new mutation, 3905insT, accounts for 4.8% of 1173 CF chromosomes in Switzerland and causes a severe phenotype. *Human Genetics*, (100), pp.220–223.

Hermann, U., Dockter, G. & Lammert, F., 2010. Cystic fibrosis-associated liver

- disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, (24), pp.585–592.
- JL., K., 2010. Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther*, 125, pp.219–229.
- Johnson, L. *et al.*, 1992. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet*, 2(1), pp.21–25.
- Kaplan, E. *et al.*, 1968. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, (279), pp.65–9.
- Karijolic, J. & Yu, Y., 2011. Converting nonsense codons into sense codons by target pseudouridylation. *Nature*, 474(3), pp.204–210.
- Kere, J. *et al.*, 1994. Cystic fibrosis in a low-incidence population: two major mutations in Finland. *Human Genetics*, (93), pp.162–166.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, *et al.*, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, (245), pp.1073–80.
- Kerem, B., 2006. Mutations specific therapy in CF. *Pediatr Respir Rev*, (7), pp.166–169.
- Khaitov, S. *et al.*, 2005. Failure of medical treatment in an adult cystic fibrosis patient with meconium ileus equivalent. *Tech Coloproctol*, (9), pp.42–4.
- Kim Chiaw, P., Eckford, P.D.W. & Bear, C.E., 2011. Insights into the mechanisms underlying CFTR channel activity, the molecular basis for cystic fibrosis and strategies for therapy. *Essays in biochemistry*, 50(1), pp.233–48.

- Kirk, K. & Wang, W., 2011. A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allosterism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Bio Chem*, (286), pp.12813–12819.
- Knowles, M., Gatzky, J. & Boucher, R., 1981. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*, 305(25), pp.1489–95.
- Kreindler JL., 2010. Cystic fibrosis: Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther*, (125), pp.219–229.
- Kristdis, P., Bozon, D. & Corey, M., 1992. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *American journal of human genetics*, (50), pp.1178–84.
- Krone, N. *et al.*, 2002. Multiplex Minisequencing of the 21-Hydroxylase Gene as a Rapid Strategy to Confirm Congenital Adrenal Hyperplasia. *Clinical Chemistry*, 48(6), pp.818–825.
- Lai, H., Cheng, Y. & Farrel, P., 2005. The survival advantage of patients with cystic fibrosis diagnosed through neonatal screening: evidence from the United States Cystic Fibrosis Foundation registry data. *J Pediatrics*, 147(3), pp.S57–S63.
- Landsteiner K., 1905. Darmverschluss durch eingedicktes meconium; pankreatites.e. *Zentrabl allg Path*, p.6:903.
- Lopez-Camelo, J., Cabello, P. & Dutra, M., 1996. A simple model for the estimation

- of congenital malformation frequency in racially mixed populations. *Braz. J. Genet.*, (19), pp.659–663.
- Lucarelli, M. *et al.*, 2011. The Genetics of CFTR: Genotype – Phenotype Relationship , Diagnostic Challenge and Therapeutic Implications. *Cystic Fibrosis – Renewed Hopes Through Research*.
- Lucotte, G., Hazout, S. & De Braekeleer, M., 1995. Complete map of cystic fibrosis mutation Df508 frequencies in Western Europe and correlation between mutation frequencies and incidence of disease. *Hum Biol*, (67), pp.797–803.
- MacDonald, K., McKenzie, K. & Zeitlin, P., 2007. Cystic fibrosis transmembrane regulator protein mutations: “class” opportunity for novel drug innovation. *Pediatric drugs*, (9), pp.1–10.
- Maróstica, P., Raskin, S. & Abreu, F., 1998. Analysis of the $\Delta F508$ mutation in Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol*, 31, pp.529–532.
- Massie, J. *et al.*, 2000. Sweat testing following newborn screening for cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, (29), pp.452–6.
- Massie, J. & Clements, B., 2005. Diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening: The australasian experience twenty years and five million babies later. *Pediatric pulmonology*.
- McCarthy, V.A. & Harris, A., 2005. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatric pulmonology*, 40(1), pp.1–8.
- Merlo, C. & Boyle, M., 2003. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab*

- Clin Med*, 141(4), pp.237–242.
- Mickle, J. & Cutting, G., 2000. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Cl North Am*, 84(3), pp.597–07.
- Miller, A., 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, (32), pp.537–542.
- Mishra, A., Greaves, R. & Massie, J., 2005. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 26(4), pp.135–53.
- Morral, N. *et al.*, 1994. Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X and 3849+10kbC --> T provide evidence of mutation recurrence in the CFTR gene. *Am. J. Hum. Genet.*, (55), pp.890–898.
- Ntimbane, T. *et al.*, 2008. Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev*, (30), pp.153–177.
- O'Sullivan, B. & Freedman, S., Cystic fibrosis. *Lancet*, 373, pp.1891–1904.
- Perone, C., Medeiros, G., *et al.*, 2010. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol*, 43(2), pp.134–138.
- Perone, C., Medeiros, G.S., *et al.*, 2010. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Brazilian journal of medical and biological research*, 43(2), pp.134–8.
- Pettit, R., 2012. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Modifying

- Medications: The future of Cystic Fibrosis Treatment. *The Annals of Pharmacotherapy*, (46), pp.1065–75.
- Quinton, P.M., 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 301(5899), pp.421–2.
- Radpour, R., Gourabi, H. & Dizaj, A., 2008. Genetic investigation of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as cause of infertility. *J Androl*, (29), pp.506–513.
- Raskin, S. *et al.*, 2003. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet. test*, (7), pp.213–218.
- Raskin, S. *et al.*, 2008. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*, (7), pp.597–608.
- Rich, D., Anderson, M. & Gregory, R., 1990. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects effective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*, (347), pp.358–63.
- Rich, D., Berger, H. & Cheng, S., 1993. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem*, (268), pp.20259–67.
- Riordan, J., CFTR functional and prospects for therapy. *ANN rev BIOCHEM*, 77, pp.701–726.
- Riordan, J. *et al.*, 1989. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science*, (245), pp.1066–73.

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.*, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, (245), pp.1066–1073.
- Rogan, M., Stoltz, D. & Hornick, D., 2011. Cystic fibrosis transmembrane regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*, (139), pp.1480–1490.
- Romeo, G., Devoto, M. & Galletta, L., 1989. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Human Genetics*, (84), pp.1–5.
- Rommens, J. *et al.*, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, (245), pp.1059–65.
- Rosa, F., Dias, F. & Morais, H., 2008. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. *Rev. Nutr*, 21(6), pp.725–737.
- Rowe, S., Miller, S. & Sorscher, E., 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, (352), pp.1992–2001.
- Rowntree, R. & Harris, A., 2003. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Hum Genet*, (67), pp.471–485.
- Sih, T. *et al.*, 2012. Cystic Fibrosis: Brazilian ENT Experience. *International journal of otolaryngology*, 2012, p.204696.
- Simmonds, N. *et al.*, 2010. Cystic fibrosis and survival to 40 years: a case-control study. *European Respiratory Journal*, 36(6), pp.1277–83.
- Slavotinek, A. & Biesecker, L., 2003. Genetic modifiers in human development and malformation syndromes, including chaperone proteins. *Hum Mol Genet*, (1),

pp.R45–R50.

Sobrinho, B. & Carracedo, A., 2005. SNP Typing in Forensic Genetics. *Humana Press*.

Steven, M., Stacey Miller, B. & Sorscher, E., 2005. Mechanisms of disease: Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, (352), pp.1992–2001.

Streit, C. *et al.*, 2003. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Molecular genetics and metabolism*, 78(4), pp.259–64. Tsui, L., 1995. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene. *Am J Respir*, (151), pp.S47–53.

Vankeerberghen, A., Cuppens, H. & Cassiman, J., 2002. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*, (290), pp.L1117–30.

Wang, Y. *et al.*, 2014. Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 52, pp.47–57. Waters, V., Stanojevic, S. & Atenafu, E., 2012. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *Eur Respir J*, (40), pp.61–66.

Watson, M.S. *et al.*, Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 6(5), pp.387–91.

Welsh, M. *et al.*, 2001. Welsh M, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: Scriver AB, Sly WS, Vall D, eds. The molecular and metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw- Hill, 5121-88, 2001. *New York:*

McGraw- Hill, pp.5121–88.

Welsh, M. & Smith, A., 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, (73), pp.1251–4.

Wine JJ and Joo NS., 2004. Submucosal Glands and Airway Defense. *Proc Am Thorac Soc*, p.1: 47–53.

Zhang, L. *et al.*, 2009. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol*, 7(07), p.e1000155.

Zielenski, J. *et al.*, 1991. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10(1), pp.214–228.

Zielenski, J., 2000. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*, (67), pp.117–133.

Zielenski, J. & Tsui, L.C., 1995. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annual review of genetics*, 29, pp.777–807..

CURRICULUM VITÆ resumido

Rispoli, T.

Dados pessoais

Nome: Thaiane Rispoli Serrano

Local e data de nascimento: Uruguaiana/RS, Brasil, 13/05/1988

Endereço profissional: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico | Departamento CDCT | Av. Ipiranga, 5400, Jardim Botânico, CEP: 90610000 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone profissional: (51) 32884000

Email: thaianerispoli@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 - 2016

Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador: Maria Lucia Rosa Rossetti.

Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2010 - 2013

Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

Orientador: Augusto Schrank.

Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

Estágios

2012 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) sob orientação do Prof. Dr. Augusto Schrank.

2011 - 2012

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica Voluntário, Carga horária: 20

Outras informações

Estagiário de Iniciação Científica Voluntária no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos Filamentosos (Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) sob a orientação do Prof. Dr. Augusto Schrank.

Experiência profissional ou didática anterior

2015 - 2015

Vínculo: Monitora de Curso prático de extensão: Monitora, Carga horária: 40

Outras informações

Monitora do Curso Prático de Extensão para Professores e Estudantes do Ensino Médio. “Curso de Férias – Edição: A Célula”

2013 - 2013

Vínculo: Monitora de disciplina, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 60

Outras informações

Monitora nas aulas da disciplina Práticas em Biologia Molecular

Artigos completos publicados

1- Castro, S; **Rispoli, T**; Dornelles, C; Chapper, M; Fischer, G; Malerba, H; Fillipon, L. Study of Three Years of Newborn Screening for Cystic Fibrosis in the Public Health System in Southern Brazil. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening* p.44-45, 2015.

2-Castro, S; Rossetti, L; Dornelles, C; Grandi, T; Fillipon, L; **Rispoli, T L**. Standardization of a Molecular Method for Mutations Detection in the CFTR Gene in Patients with Cystic Fibrosis Suspicion in Southern Brazil. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening* p.23, 2015.

3-STAATS, CHARLEY CHRISTIAN ; JUNGES, ÂNGELA ; GUEDES, RAFAEL LUCAS ; THOMPSON, CLAUDIA ELIZABETH ; DE MORAIS, GUILHERME LOSS ; BOLDO, JULIANO TOMAZZONI ; DE ALMEIDA, LUIZ GONZAGA ; ANDREIS, FÁBIO CARRER ; GERBER, ALEXANDRA LEHMKUHL ; SBARAINI, NICOLAU ; DA PAIXÃO, RANA LOUISE ; BROETTO, LEONARDO ; LANDELL, MELISSA ; SANTI, LUCÉLIA ; DA SILVA, WALTER ORLANDO ; SILVEIRA, CAROLINA PEREIRA ; **Serrano, Thiane Rispoli** ; DE OLIVEIRA, EDER SILVA ; KMETZSCH, LÍVIA ; VAINSTEIN, MARILENE HENNING ; DE VASCONCELOS, ANA TEREZA ; SCHRANK, AUGUSTO . Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics*, v. 15, p. 822, 2014.

Citações:1|1

Resumos e trabalhos apresentados em Congressos

SIMONE MARTINS DE CASTRO; MARTA CHAPPER; HELENA MALERBA; GILBERTO BUENO FISCHER; CLÁUDIA DORNELLES; **THAIANE RISPOLI**; TARCIANA GRANDI; LETÍCIA FILIPPON. Análise de dois anos da triagem neonatal para fibrose cística na rede pública do estado do Rio Grande Do Sul. In: V Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, Gramado, RS-Brasil. 2015

THAIANE RISPOLI SERRANO; LETÍCIA FILIPPON; MARTA CHAPPER; HELENA MALERBA; GILBERTO BUENO FISCHER; CLÁUDIA DORNELLES; TARCIANA

GRANDI; SIMONE MARTINS DE CASTRO. Determinação da mutação $\Delta F508$ em pacientes sob investigação de fibrose e que foram a óbito. In: V Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, Gramado, RS-Brasil. 2015

Rispoli, T.; Junges A; Schrank A. Functional analysis of ChiMaA4 chitinase from *Metarhizium anisopliae*. In: 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos., 2012, Foz do Iguaçu. 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos., 2012.

OLIVEIRA, N. S.; Junges A; **Rispoli, T.**; MINGORI, M. R.; Schrank A . DIVERSITY OF CHITINASES AMONGST METARHIZIUM ANISOPLIAE ISOLATES. In: 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos., 2012, Foz do Iguaçu. 28ª REGEM - Reunião de Genética de Microrganismos., 2012.

Rispoli, T.; Schrank A. Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Resumos do XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2012.

Rispoli, T.; Junges A ; Schrank A . Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Livro de Resumos da XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2012.

SBARAINI, NICOLAU; Junges A.; **Rispoli, T.** ; MINGORI, M. R. ; Schrank A . Diversidade de quitinases em isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Livro de Resumos da XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2012.

Rispoli, T.; FALCAO, V. C. A; Junges A ; Schrank A . Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011, Porto Alegre. Resumos do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011.

Rispoli, T.; Falcão, Virginia; Junges A ; Schrank A . Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos da XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2011.