

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FIBROSE CÍSTICA: NOVA ABORDAGEM DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E
ESTUDOS *IN SILICO* DOS MECANISMOS MOLECULARES DA DOENÇA**

Tese de Doutorado

THAIANE RISPOLI SERRANO

Porto Alegre
Dezembro de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**FIBROSE CÍSTICA: NOVA ABORDAGEM DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR E
ESTUDOS *IN SILICO* DOS MECANISMOS MOLECULARES DA DOENÇA**

THAIANE RISPOLI SERRANO

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Coorientador: Dr. José Eduardo Vargas

Porto Alegre

Dezembro de 2020

Instituições e fontes financiadoras

Este trabalho foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) pertencente ao Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS) da Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (SES-RS). O projeto recebeu apoio financeiro 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, do departamento de Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS) e do Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS).

A aluna recebeu bolsa de doutorado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS (PPGBCM/UFRGS).

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos pacientes com Fibrose
Cística, seus familiares e cuidadores.*

“Our understanding of CF continues to evolve as scientists study what causes the disease and how it affects the body.

These insights drive the development of new and better treatments and bring us one step closer to a cure.”

Cystic Fibrosis Foundation

Agradecimentos

À professora Dra. Maria Lucia Rossetti, agradeço pela orientação, confiança, disposição sempre imediata em me ouvir e por ter aberto as portas do CDCT para mim desde o meu estágio final da graduação, passando pelo mestrado e agora, no doutorado. Obrigada por todo apoio, acolhimento e amizade.

Ao meu coorientador Dr. José Eduardo Vargas, agradeço por todos os ensinamentos e apoio, em todos os passos da pesquisa, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela presença, confiança, paciência e amizade.

À banca examinadora, Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino, Dr. Charley Christian Staats e Dr. Rodrigo Ligabue-Braun, pela revisão e avaliação deste trabalho e pelas valiosas contribuições para a versão final da tese.

Aos médicos Dr. Leonardo Pinto, Dr. Gilberto Fischer, Dr. Paulo Maróstica, Dra. Helena Mocelin e demais integrantes dos Serviços de Fibrose Cística dos hospitais São Lucas da PUCRS, Santo Antônio do Complexo da Santa Casa, Clínicas e do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV). Obrigada pela confiança e por toda a colaboração que formamos que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Foi muito gratificante conhecer todo o atendimento realizado pela equipe multidisciplinar nos ambulatórios de FC de cada hospital.

Um agradecimento especial a todos os pacientes com fibrose cística que participaram deste estudo, para os quais dedico este trabalho. Agradeço a confiança das famílias e a participação dos pacientes no estudo. Espero ter podido ajudar um pouco e que os resultados aqui apresentados possam contribuir para um futuro melhor para todos que vivem com FC. Agradeço também às associações de FC do RS que colaboraram conosco: Associação Gaúcha de Assistência a Mucoviscidose (AGAM), Associação de Apoio a Portadores de Mucoviscidose do Rio Grande do Sul (AMUCORS) e Associação de Peito Aberto.

À Dra. Simone Martins de Castro, chefe do Serviço de Referência em Triagem Neonatal do RS do HMIPV. Obrigada por todos os ensinamentos desde o mestrado, por ter acreditado em mim e por ter sido acima de tudo uma amiga, conselheira e exemplo de profissional e mulher.

À Grazielle Motta Rodrigues, que iniciou como minha IC, e se tornou uma grande amiga, grande companheira, a minha “dupla de sucesso”, com a qual dividi diversos momentos e madrugadas científicas, momentos de aflições, mas também muitos momentos de alegria. Obrigada pela parceria, amizade, e exemplo de perseverança.

À Dra. Joice de Faria Poloni e ao Dr. Maurício Menegatti Rigo pelos valiosos conselhos na biologia *in silico*, por todo o apoio, pelas conversas, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, e toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela amizade construída.

Aos meus amigos e colegas do CDCT, que foram minha segunda família durante estes anos de laboratório no LACEN/RS. Obrigada por todos os ensinamentos, troca de experiências, aprendizados, companheirismo e principalmente pelos dias de trabalho divertidos e animadores. Agradeço, em especial, ao nosso grupo de Doenças Genéticas: Cláudia Dornelles, Tarciana Grandi, Mayara Prado, Grazielle Rodrigues, Gabriel Aires e Betânia Ponce. Obrigada por me estimularem cientificamente e por todos os ensinamentos transmitidos.

Às minhas queridas amigas Amandita, Cris, Lu e May que dividiram comigo minhas angústias, mas também minhas melhores risadas e conquistas. Obrigada por toda a amizade e o companheirismo durante estes onze anos de amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), professores e funcionários pela excelência do ensino oferecido, pela dedicação e apoio.

À Silvia Centeno, nossa querida Silvinha, por toda a alegria, paciência e amizade. Obrigada por estar sempre mais que disponível para ajudar em tudo que precisei ao longo da pós-graduação.

Ao meu avô Antônio, que não está mais presente fisicamente. Obrigada por ter sido tão único em minha vida e por todo o amor incondicional de pai dedicado a mim. Sei que estás orgulhoso de onde estiver.

Às três mulheres da minha vida, vó Élide, mãe Cristina e tia-mãe Mônica. Obrigada por manterem seus valores tão sólidos e por serem meu exemplo de garra, determinação e principalmente de dedicação ao trabalho. Obrigada por todos os abraços, telefonemas e

orações. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por todo suporte e amor incondicional que me foi dado.

Ao meu irmão Uilton, “mano”, obrigada por todo amor, carinho, suporte e momentos de alegria.

Ao Elias, Anair, Marcelo e Alexandre, minha segunda família. Obrigada pelo carinho, conselhos e apoio de sempre.

E por fim, agradeço ao meu marido Eduardo. Obrigada por ser o melhor amigo e companheiro que eu poderia ter ao meu lado. Obrigada por todo o carinho, pela sua participação ativa em minha vida e por todo apoio e amor. Te Amo!

Sumário

Lista de abreviaturas	xi
Lista de símbolos e unidades	xii
Lista de figuras e tabelas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1 Introdução	1
1.1 Fibrose Cística: marcos históricos.....	1
1.2 Descrição da doença	6
1.2.1 Manifestações clínicas	9
1.3 Do gene <i>CFTR</i> à proteína CFTR.....	17
1.3.1 Características do gene <i>CFTR</i>	17
1.3.2 Variantes no gene <i>CFTR</i>	17
1.3.3 Características da proteína CFTR.....	20
1.3.4 Diferentes mecanismos moleculares de disfunção da CFTR na FC: classes das variantes.....	23
1.4 Variabilidade na correlação entre fenótipo-genótipo: diferentes aspectos relacionais	27
1.5 Diagnóstico	29
1.6 Cuidados com a FC: tratamento	33
2 Justificativa	37
3 Objetivos	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 Capítulo I - Artigo 1 (Publicado): <i>Cystic Fibrosis: A Simple and Customized for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns</i>	41
5 Capítulo II - Artigo 2 (Publicado): <i>Novel frameshift variant of the CFTR gene: S511Lfs*2 from phenotype to molecular predictions</i>	52
6 Capítulo III - Artigo 3 (a ser submetido): <i>Systems analysis of bronchial and rectal epithelium from homozygous p.Phe508del variant patients</i>	60
7 Discussão Geral	87
8 Conclusões	100
9 Perspectivas	101
10 Referências Bibliográficas	102
Anexos	115

Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	116
Anexo II - Pareceres dos Comitês de Ética e Pesquisa das Instituições	124
Anexo III - Artigo publicado: <i>A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System</i>	144
Anexo IV - Artigo publicado: <i>Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with cystic fibrosis in Southern Brazil</i>	154
Anexo V - Artigo publicado: <i>False-negative newborn screening result for immunoreactive trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease</i>	162
Curriculum Vitae resumido	165

Lista de abreviaturas

ACMG	<i>American College of Mendelian Genetics</i>
ASL	<i>Airway surface liquid</i> (Líquido da superfície das vias aéreas)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Adenosina monofosfato cíclico)
CBAVD	<i>Congenital bilateral aplasia of the vas deferens</i> (Ausência bilateral congênita dos vasos deferentes)
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (Regulador da condutância transmembranar da fibrose cística)
CFTR1	<i>Cystic Fibrosis Mutation Database</i> (Banco de dados de mutação de fibrose cística)
CFTR-RD	<i>CFTR-related disorders</i> (desordens relacionadas a CFTR)
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> (Guanosina monofosfato cíclico)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
FC	Fibrose cística
GI	Gastrointestinal
IC	Intervalo de confiança
IM	Íleo meconial
IP	Insuficiência Pancreática
IRT	<i>Immunoreactive trypsinogen</i> (tripsinogênio imunorreativo)
NBD	<i>Nucleotide binding domains</i> (Domínios de ligação de nucleotídeos)
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Par de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	<i>Protein Kinase A</i> (Proteína cinase A)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína cinase C)
PS	<i>Pancreatic sufficiency</i> (Suficiência pancreática)
RD	<i>Regulator domain</i> (Domínio regulador)
SNaPshot	<i>Single Nucleotide Primer Extension</i>
SNP	<i>Single Nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
SOID	Síndrome de obstrução intestinal distal
TMD	<i>Transmembrane domains</i> (Domínios transmembrânicos)
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WT	<i>Wild Type</i> (Tipo Selvagem)

Lista de símbolos e unidades

%	Por cento
<	Menor
>	Maior
≤	Menor e igual
≥	Maior e igual
°C	Graus Célsius
Ca⁺	Íon cálcio
Cl⁻	Íon cloreto
g	Gramma
H₂O	Água
HCO₃	Bicarbonato
K⁺	Íon potássio
kb	Quilobase
mg	Miligramma
mg/mL	Miligramma por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/L	Milimoles por litro
mV	Milivolts
Na⁺	Íon sódio
µg	Microgramma
µg/mL	Microgramma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar

Lista de figuras e tabelas

Lista de Figuras

Figura 1. Demografia de pacientes com fibrose cística em diferentes países.....	7
Figura 2. Características clínicas da fibrose cística.	9
Figura 3. Cascata fisiopatológica do distúrbio respiratório na fibrose cística	11
Figura 4. Patogênese da doença pancreática na FC	13
Figura 5. Esquema com a representação do gene à estrutura da proteína	19
Figura 6. Painéis de modelos para explicar a diferença de potencial transepitelial do epitélio das vias aéreas na FC.....	22
Figura 7. Painéis com esquema dos mecanismos associados aos níveis elevados de NaCl no suor de pacientes com FC	23
Figura 8. Mecanismos da proteína CFTR desde a transcrição até a ancoragem na superfície celular, até o funcionamento.....	26
Figura 9. Espectro de fenótipos associados ao gene <i>CFTR</i> . A gravidade dos fenótipos associados a <i>CFTR</i> reflete o espectro dos genótipos <i>CFTR</i>	27
Figura 10. Esquema da relação entre genótipo e fenótipo, e a influência de fatores adicionais, como genes modificadores, toda a base genética, epigenética e efeitos ambientais sobre a fibrose cística	28
Figura 11. Representação do fluxograma da triagem neonatal realizada no estado do Rio Grande do Sul.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de tratamentos e intervenções médicas empregados na FC.....	34
--	----

Resumo

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva com grande espectro de variabilidade clínica e mais de 2.000 variantes descritas. Afeta células epiteliais de diversos órgãos como pulmões, intestino, pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e glândulas sudoríparas exócrinas. Este distúrbio é causado pelo funcionamento anormal da proteína Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR). Abordagens multifatoriais vêm aumentando a sobrevivência de pacientes com FC, e nos recentes anos, o desenvolvimento de modernos medicamentos moduladores da CFTR tem realizado a transição da abordagem terapêutica profilática e sintomática para uma nova era da medicina de precisão, em que o medicamento visa a alteração básica da proteína CFTR de acordo com o genótipo do paciente, corrigindo a síntese, o tráfego ou a função da proteína que está sendo afetada. Com o tempo, estes fármacos tornam-se custo acessíveis, e para tornar viável a sua prescrição, além da aplicação de outras abordagens precisas conforme o genótipo do indivíduo, é fundamental que o paciente tenha o conhecimento da variante causadora da sua doença. Esta informação valiosa o acompanhará ao longo de sua vida, melhorando seu prognóstico. Em complemento, é necessário identificar e estudar as variantes e seus mecanismos moleculares. Modelos *in silico* são ferramentas úteis para prever o grau de patogenicidade de variantes incertas, auxiliando a elucidar a alteração da proteína a nível estrutural. Além disso, ferramentas de biologia de sistemas são essenciais para compreensão dos impactos das variantes em nível sistêmico. Três estudos foram realizados visando contribuir nesta temática. Em um primeiro estudo, objetivou-se padronizar um método custo-efetivo de extensão de base única para ampliação da cobertura de detecção do sistema de saúde pública do estado do Rio Grande do Sul, das atuais 12 para 37 variantes no gene *CFTR*. Em um segundo estudo, identificou-se uma nova variante causadora de defeito no gene *CFTR*, e previu-se sua patogenicidade empregando análise computacional. Por último, uma análise *in silico*, por biologia de sistemas, avaliou o perfil da expressão gênica em tecido brônquico e retal de indivíduos com FC (p.Phe508del homozigoto) e indivíduos controle. Os resultados do método de extensão de base única foram a ampliação da cobertura no diagnóstico molecular, com detecção de 93,01% dos alelos mutados conhecidos para FC na população brasileira. A nova variante encontrada (S511Lfs*2) é do tipo *frameshift*, e de acordo com o modelo *in silico*, de alta patogenicidade, associada a nenhuma síntese da proteína CFTR. Por fim, os estudos de biologia de sistemas nos epitélios brônquico e retal evidenciaram mecanismos que conduzem ao fenótipo da doença, por ontologias em comum entre os dois tecidos, mas também ontologias específicas. Todos estes estudos visam contribuir para uma melhor abordagem terapêutica, melhor qualidade de vida e um melhor prognóstico dos pacientes fibrocísticos.

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease with a wide spectrum of clinical variation and more than 2,000 different variants. It affects epithelial cells of several organs such as lungs, intestines, pancreas, liver, reproductive system and exocrine sweat glands. This disorder is characterized by the abnormal functioning of the Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) protein. Multifactorial approaches have increased the longevity of CF patients, and in recent years, the development of modern CFTR-modulating drugs has made a transition from the prophylactic and symptomatic therapeutic approach to a new era of precision medicine, in which the drug targets the base CFTR defect according to the patient's genotype, correcting the synthesis, traffic or function of the protein being affected. Over time, these drugs become cost-affordable, and to make their prescription viable, in addition to other precise approaches depending on the individual's genotype, it is essential that the patients know the variants that they have. This valuable information will accompany them throughout their life, improving their prognosis. In addition, it is necessary to identify and study variants and its molecular mechanisms. *In silico* models are useful tools to predict the degree of pathogenicity of uncertain variants, helping to elucidate the protein alteration at a structural level. In addition, systems biology tools are essential for understanding the impacts of variants at the system level. Three studies were carried out to cover up these themes. In a first study, the aim was to standardize a cost-effective minisequencing method to expand the detection coverage of the public health system in the state of Rio Grande do Sul, from the current 12 to 37 variants of the *CFTR* gene. In a second study, a new variant causing a defect in the *CFTR* gene was identified, and its pathogenicity was predicted using computational analysis. Lastly, an *in silico* analysis, by systems biology, evaluated the gene expression profile in bronchial and rectal tissues of FC individuals (p.Phe508del homozygous) and control individuals. The results of the minisequencing method were the expansion of the molecular diagnosis coverage, with detection of 93.01% of the known mutated alleles for CF in the Brazilian population. The new variant found (S511Lfs*2) is a frameshift type, and according to the *in silico* model, of high pathogenicity, associated with no CFTR protein synthesis. Finally, systems biology studies in the bronchial and rectal epithelia evidenced mechanisms that lead to the disease phenotype, through common ontologies between the two tissues, but also specific ontologies. All these studies aim to contribute to a better therapeutic approach, a better quality of life and a better prognosis for fibrocystic patients.

1 Introdução

1.1 Fibrose Cística: marcos históricos

Pesquisas remontam a história da fibrose cística (FC) às sociedades primitivas do leste Europeu, quando se relata o suor anormalmente salgado, reconhecido por parteiras, como um sinal de que o recém-nascido estaria fadado a morte precoce por congestão crônica das vias respiratórias, assim como, por problemas no trato gastrointestinal (Quinton 1999).

Em 1905, Landsteiner, pela primeira vez, fez uma descrição anatomopatológica da FC em um recém-nascido falecido no quinto dia de vida por íleo meconial (Landsteiner 1905).

Em 1936, Fanconi e colaboradores (Fanconi *et al.* 1936), diagnosticaram pacientes que apresentavam "síndrome celíaca" juntamente com alterações pancreáticas, sendo esta publicação considerada por muitos pesquisadores a primeira descrição da FC. Porém, em 1938, o estudo "Fibrose Cística do pâncreas e sua relação com a doença celíaca: um estudo clínico e patológico" de Dorothy Andersen foi a primeira publicação que reconheceu a FC como uma doença, a diferenciou da doença celíaca, descreveu a obstrução neonatal, as alterações gastrointestinais decorrentes da obstrução dos ductos glandulares pelo muco, as complicações respiratórias e, ainda, propôs um modelo terapêutico ao tratamento da doença (Andersen 1938).

Em 1943, a "FC do pâncreas" foi alternativamente denominada de mucoviscidose, já que se constatou que o muco espesso decorrente da doença se acumulava em diferentes ductos das glândulas mucosas do corpo e órgãos. Além disso, destacou que os danos no sistema respiratório eram dependentes primeiramente pela obstrução por muco e secundariamente pela infecção pelo *Staphylococcus aureus* (Farber *et al.* 1943).

Em 1946, Andersen e Hodges, descreveram a FC como uma doença genética com padrão autossômico recessivo (Andersen e Hodges 1946). Nesta mesma época, Paul di Sant'Agnese, considerou que a nutrição era um componente primordial no tratamento e que, durante a tosse crônica, o uso de antibióticos era fator importante para o estabelecimento da melhora clínica (Di Sant'Agnese e Andersen 1946).

No Brasil, a primeira publicação sobre FC foi de autoria de Gesteira que, em 1949, revisou os conhecimentos sobre a doença e seus métodos de diagnósticos. Ressaltou a existência da FC em nosso meio e chamou atenção para a ausência de publicações até aquela data (Gesteira 1949).

Na década de 1950, começaram a surgir os primeiros centros especializados no tratamento da FC, possibilitando significativos avanços através de novas modalidades terapêuticas (disponível em <https://www.cff.org>).

A conexão entre o transporte de sal e a FC foi realizada por Kessler e Andersen em 1951 (Kessler e Andersen 1951). Eles observaram que crianças admitidas no hospital sofriam de prostração no calor, com sintomas de vômitos e sinais de choque sem evidência 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 (Kessler e Andersen 1951).

Baseado nessas observações, Paul Sant'Agnese e seus colaboradores publicaram, no ano de 1953, estudos 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 (Carling *et al.* 1953; Di Sant'Agnese *et al.* 1953a, b). Estes achados

levaram Gibson & Cooke, em 1959, a desenvolver o teste de suor como um teste de diagnóstico da fibrose cística considerado até hoje como teste padrão-ouro (Gibson e Cooke 1959).

Nos anos 60, organizações internacionais e nacionais para apoio e investigação da FC foram criadas, mas mesmo assim, crianças afetadas tinham uma perspectiva de vida baixa e a maioria dos indivíduos falecia durante a infância ou adolescência (ICFMA). No ano de 1966, foi publicado um estudo sobre a sobrevivência de 499 pacientes com FC entre 1943 e 1964 (Mantle e Norman 1966). O estudo observou que 20% dos pacientes tinham morrido em um ano, e 80% em cinco anos a partir do diagnóstico, demonstrando, assim, que a FC continuava possuindo um prognóstico sombrio (Mantle e Norman 1966).

A partir de 1970, outras manifestações da doença começaram a ser descritas, incluindo pancreatites recorrentes em pacientes com função pancreática normal (Shwachman *et al.* 1975). O aumento da sobrevivência média aumentou de 14 anos, em 1968, para 20 anos em 1975 (Robinson e Norman 1975). A abordagem do diagnóstico neonatal foi instituída nesta mesma época, porém, com o tratamento disponível, o panorama era pobre sempre que o diagnóstico era realizado (Lawson 1972).

Em 1976, percebeu-se que o prognóstico ruim estava associado a infecção crônica pela *Pseudomonas aeruginosa* (Hoiby 1977), resultando no estabelecimento de uma estratégia com terapia intravenosa de antibióticos a cada três meses (Szaff *et al.* 1983).

A bactéria oportunista gram-negativa *Burkholderia cepacia*, que havia sido isolada em 1967 na América do Norte (Moffet e Williams 1967; Gefitc *et al.* 1979), apareceu posteriormente com maior frequência tanto na América do Norte (Isles *et al.* 1984), como também no Reino Unido (Simmonds *et al.* 1990). A gravidade e a natureza da doença fatal,

associada à razão de indivíduos infectados e sua tendência à propagação dentro dos Centros de Referência, levou a alterações significativas na prática clínica e nos hábitos sociais dos doentes (Govan *et al.* 1993). Além disso, as observações de infecção cruzada por microrganismos, cada vez mais virulentos, ganharam destaque (disponível em <https://www.cff.org>).

Nos anos 1980, foi demonstrado que o potencial nasal (PN) era alterado em indivíduos com FC, evidenciando a disfunção epitelial (Knowles *et al.* 1981). Paul Quinton, em 1983, demonstrou que as glândulas de suor apresentavam impermeabilidade ao cloreto (Quinton 1983). Quinton acreditou que uma alteração generalizada na permeabilidade do íon Cl⁻ 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 para FC no braço longo do cromossomo 7 (Knowlton *et al.* 1985; Wainwright *et al.* 1985). Em 1989, num esforço colaborativo internacional Riordan, Rommens, Kerem e colaboradores identificaram o gene responsável pela FC (Rommens *et al.* 1989; Riordan *et al.* 1989) e o denominaram de “Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator” (*CFTR*) (Tsui *et al.* 1985; Riordan *et al.* 1989; Collins *et al.* 1990). Além disso, observaram que na maioria dos pacientes com FC, o gene tinha uma alteração de três nucleotídeos que resultava na deleção de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da proteína (F508del ou p.Phe508del) (Kerem 1989; Riordan *et al.* 1989; Drumm *et al.* 1990). A proteína codificada por este gene também foi denominada pelo grupo de pesquisadores como CFTR (Collins *et al.* 1990). Em

seguida, reconheceram que se a CFTR não era um canal de íons cloreto, ela certamente tinha a função reguladora da atividade de um canal de Cl^- (Riordan *et al.* 1989).

Ainda durante os anos de 1990, houve tentativas, mal sucedidas, de correlacionar o genótipo e o fenótipo, somente se observando correlação das variantes mais leves com a preservação da função pancreática e melhor condição clínica (Kristidis *et al.* 1992).

Atualmente, o tratamento tem como objetivo a melhor qualidade de vida e maior sobrevida dos pacientes, sendo baseado no consenso criado pela organização *Cystic Fibrosis Foundation* (disponível em <https://www.cff.org>). Os medicamentos inalatórios, mucolíticos e antibióticos, passaram a ser frequentemente utilizados por sua atuação rápida e eficiente. Na nutrição, o acompanhamento foi adaptado para cada fase da vida, respeitando as alterações ao longo do crescimento (Barbosa e Sztajnbok 1999).

A partir da melhor compreensão das bases moleculares da FC foi possível o desenvolvimento de novos métodos e abordagens terapêuticas, e a busca de tratamentos farmacêuticos visando corrigir os defeitos moleculares na CFTR. Esses medicamentos, chamados de moduladores CFTR, buscam melhorar a produção, processamento ou expressão da proteína e incluem corretores, potencializadores, estabilizadores, amplificadores e agentes de sobreleitura (*read-through*) (Clancy *et al.* 2019; Lopes-Pacheco 2020). Esta abordagem é denominada medicina de precisão, sendo considerada variante-específica, pois o tipo de moléculas a serem administradas aos pacientes depende do tipo de variantes no gene *CFTR* que eles carregam. Muitos estudos foram realizados nesse campo na última década e levaram a importantes estudos clínicos e avanços no tratamento, com melhorias significativas nos prognósticos dos pacientes com FC.

1.2 Descrição da doença

A FC (OMIM: #219700), historicamente, era definida como o distúrbio hereditário, com risco de vida mais comum em crianças de populações euro-descendentes, com uma incidência de 1:2.500 nascidos vivos (Scotet *et al.* 2020). Contudo, esta definição não é mais apropriada atualmente. Nas últimas décadas, diversos avanços no diagnóstico e tratamento da fibrose cística mudaram drasticamente o cenário dessa doença, resultando em aumento significativo da sobrevida e ganho de qualidade de vida dos pacientes (Corriveau *et al.* 2018). A idade média estimada de vida de pacientes com FC, hoje, está perto de 50 anos (Scotet *et al.* 2020).

Esta doença afeta mais de 90.000 pessoas, distribuídas de forma heterogênea em todo o mundo (**Figura 1**) (Lopes-Pacheco 2020). A variante causadora da FC mais prevalente é a p.Phe508del, afetando aproximadamente 82% da população com FC (70% dos alelos) (acessado em 01 de novembro de 2020, disponível em <https://cftr2.org>).

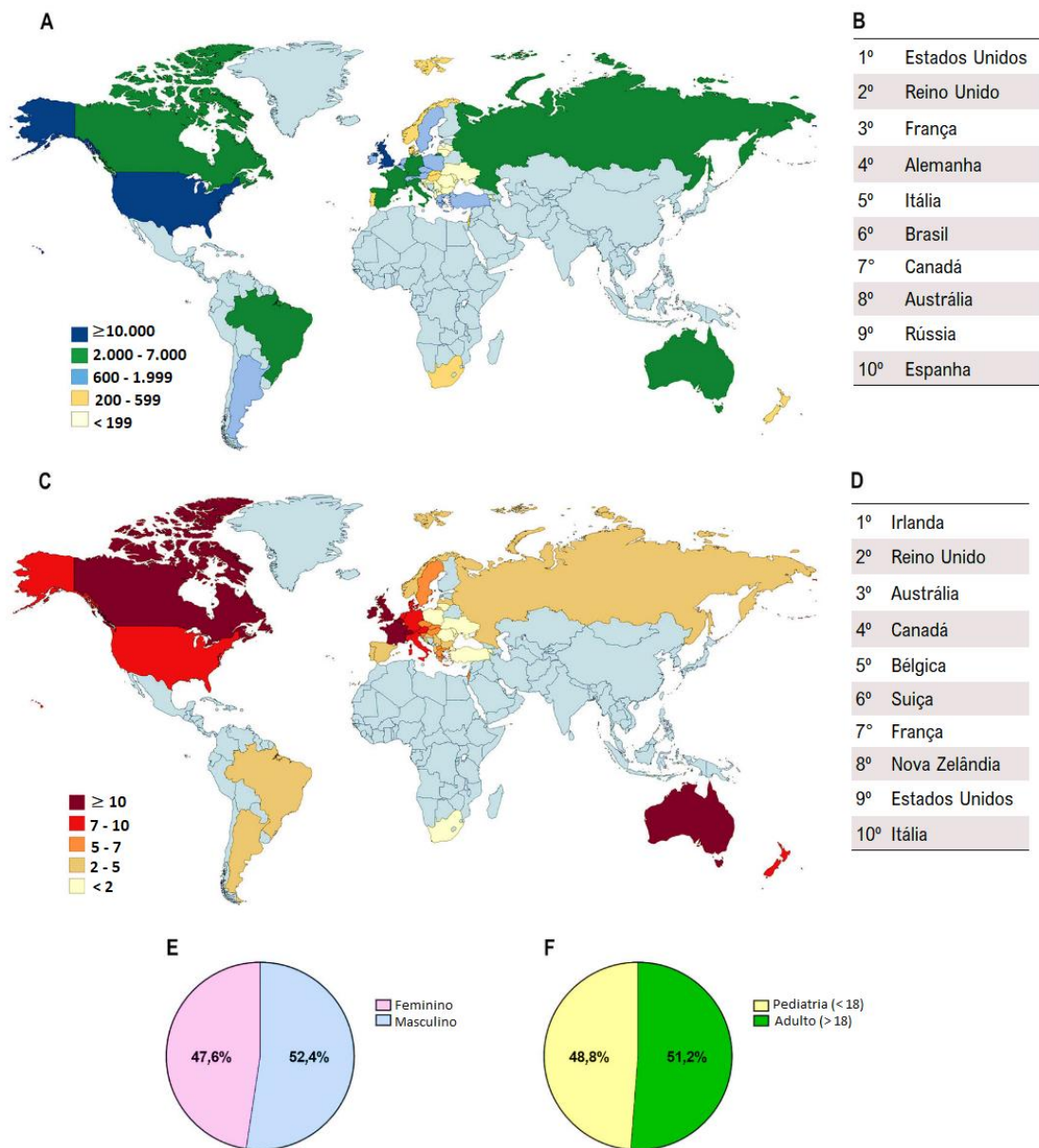


Figura 1. Demografia de pacientes com fibrose cística em diferentes países. (A) Distribuição de acordo com o número total de pacientes cadastrados. (B) Os 10 principais países com o maior número de pacientes registrados. (C) Distribuição de acordo com a prevalência estimada de pacientes por 100.000 habitantes. (D) Os 10 principais países com o maior número de pacientes por 100.000 habitantes. Distribuição global por gênero (E) e por idade (F). Adaptado de Lopes-Pacheco 2020.

A FC é uma doença genética de herança autossômica recessiva (Zielenski 2000). O termo FC é utilizado para aqueles pacientes que possuem expressão alterada ou ausência da proteína CFTR, que em condições normais, atua como canal de transporte para Cl^- , e que

apresentam características clínicas compatíveis com a descrição da doença (Rosenfeld *et al.* 2016; Farrell *et al.* 2017).

A proteína CFTR é responsável pelo transporte de íons cloreto através das membranas apicais das células epiteliais em tecidos das vias aéreas, intestino, pâncreas, rim, glândula sudorípara e trato reprodutor masculino. Além disso, sabe-se que a proteína tem funções adicionais, como a secreção de bicarbonato, que regula o pH do líquido da superfície das vias aéreas, e a inibição do canal epitelial de sódio (*epithelial sodium channel* - ENaC), que tem papel importante na hidratação de secreções e mucinas (Bell *et al.* 2020).

A deficiência na proteína CFTR resulta em 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 (**Figura 2**) (Scotet *et al.* 2020).

O quadro clínico clássico de FC é caracterizado principalmente por doença obstrutiva crônica das vias aéreas com colonização bacteriana predominantemente por microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e má digestão de gordura devido à insuficiência pancreática (Castellani e Assael 2017).

Existem também manifestações clínicas incompletas. Estas são condições determinadas por variantes no gene *CFTR*, mas que não dão origem ao caso típico de FC. São definidas como desordens relacionadas à CFTR (*CFTR-related disorder*) que não cumprem os critérios de diagnóstico para FC. As manifestações clínicas são limitadas a um único distúrbio e incluem episódios de pancreatite recorrente ou isolados e bronquiectasia bilateral. Homens podem manifestar ausência bilateral dos canais deferentes (*congenital*

bilateral absence of the vas deferens - CBAVD) sem envolvimento do aparelho digestivo ou respiratório (Bombieri *et al.* 2011; Castellani e Assael 2017).

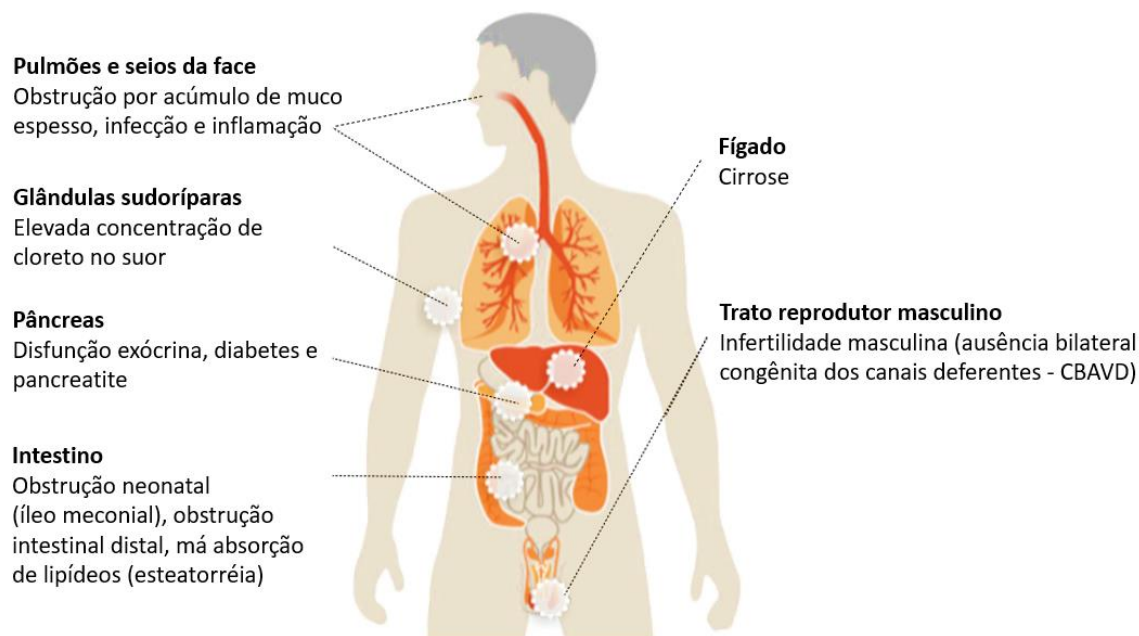


Figura 2. Características clínicas da fibrose cística. Adaptado de Cutting 2015.

1.2.1 Manifestações clínicas

1.2.1.1 Manifestações respiratórias

Infecção pulmonar crônica levando a insuficiência respiratória é a principal causa de morte e o principal determinante da gravidade da doença na qualidade de vida (**Figura 3**) (Ratjen *et al.* 2015).

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 respiratório (Ratjen *et al.* 2015). A hidratação ASL é alcançada através do estabelecimento de um gradiente osmótico por um efluxo predominante de íons cloreto através da proteína CFTR, juntamente com um moderado influxo de íons de sódio

através dos canais epiteliais de sódio (*epithelial sodium channel* - ENaC) na membrana apical, também regulados pela CFTR (Ratjen *et al.* 2015; Castellani e Assael 2017).

Nos pulmões, a falta de CFTR ou sua deficiência resulta em menor teor de água no fluido periciliar e, portanto, em muco mais viscoso. Além disso, a CFTR regula negativamente o ENaC e o conseqüente aumento de reabsorção de sódio reduz a hidratação e aumenta a densidade do muco brônquico. As secreções viscosas acabam impedindo a atividade ciliar e seu mecanismo de limpeza (Lopes-Pacheco 2016). Sem intervenção, essa situação se deteriora gradualmente causando entupimento de pequenas vias respiratórias, infecção bacteriana, inflamação crônica local e, eventualmente, bronquiectasias (Justicia *et al.* 2015; Castellani e Assael 2017). Ainda, a diminuição das defesas nos pulmões permite o estabelecimento de bronquite bacteriana crônica, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, mas também *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, e *Burkholderia cepacia*, acompanhadas por intensa inflamação e destruição das vias aéreas (Cribbs e Beck 2017; Savant e McColley 2017).

Além disso, as bactérias não são os únicos agentes microbiológicos relacionados com o desenvolvimento de doenças pulmonares. Infecções virais podem desencadear exacerbações pulmonares em pacientes com FC, que também são mais propensos para infecções fúngicas, particularmente para *Aspergillus fumigatus* e *Scedosporium Apiospermium*. O aumento de reações alérgicas ao *Aspergillus* (Aspergilose Broncopulmonar Alérgica) é característica da FC (Cribbs e Beck 2017; Castellani e Assael 2017).

Por fim, as exacerbações pulmonares repetidas em indivíduos com FC têm contribuído para um declínio acelerado da função pulmonar, acarretando em falência

pulmonar, que no caso de insucesso ou indisponibilidade de transplante pulmonar conduz à morte (Morrell e Pilewski 2016; Ramos *et al.* 2019).

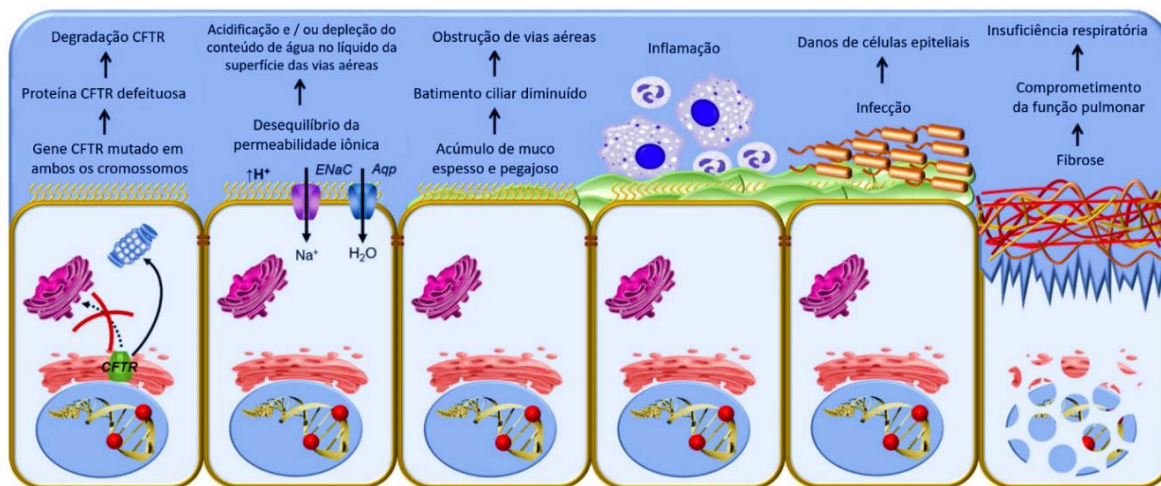


Figura 3. Cascata fisiopatológica do distúrbio respiratório na fibrose cística - O mecanismo celular da fibrose cística começa com o gene *CFTR* (regulador da condutância transmembrana da fibrose cística) defeituoso e a escassez do canal CFTR na membrana plasmática. Um ciclo vicioso de obstrução das vias aéreas, inflamação e infecção leva a danos epiteliais, remodelação pulmonar e doença pulmonar em estágio terminal. ENaC, canal epitelial de Na^+ ; Aqp, aquaporina. Adaptado de Lopes-Pacheco 2016.

1.2.1.2 Manifestações nas glândulas sudoríparas

Pacientes com FC apresentam secreção com alta concentração de cloreto de sódio pelas glândulas sudoríparas como característica. Elevados níveis de íons cloreto no suor, superiores a 60 mmol/L, são frequentemente verificados na maior parte dos pacientes diagnosticados com FC (Rowe *et al.* 2005; Athanazio *et al.* 2017; Servidoni *et al.* 2017).

A ausência ou a disfunção da proteína CFTR é responsável por esta anomalia, que mantém-se presente ao longo de toda a vida, desde o nascimento do indivíduo (Welsh *et al.* 2001). Em pessoas 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 (Rowe *et al.* 2005; De Boeck *et al.* 2017). A perda excessiva de água e eletrólitos em indivíduos fibrocísticos 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 íons cloreto no suor de 20 mmol/L), enquanto portadores saudáveis têm atividade de 50% (nível médio de íons cloreto no suor de 26 mmol/L). Para os casos de pacientes com uma variante grave e outra leve são verificadas concentrações médias de 80 mmol/L. Já nos pacientes com duas variantes graves, as concentrações de íons cloreto no suor atingem em média de 100 mmol/L (Massie e Clements 2005).

1.2.1.3 Manifestações pancreáticas e gastrointestinais

A CFTR é expressa em células epiteliais de ductos pancreáticos normais e ao longo do trato gastrointestinal (GI). No pâncreas, a perda da função da proteína resulta na redução do conteúdo de água e pH reduzido das secreções pancreáticas. O aumento da viscosidade do conteúdo luminal e a presença de enzimas pancreáticas causam obstrução e destruição progressiva dos ácinos, inflamação (pancreatite), formação de cistos e fibrose (**Figura 4**) (Wilschanski e Novak 2013; Freeman e Ooi 2017; Di Paolo *et al.* 2020).

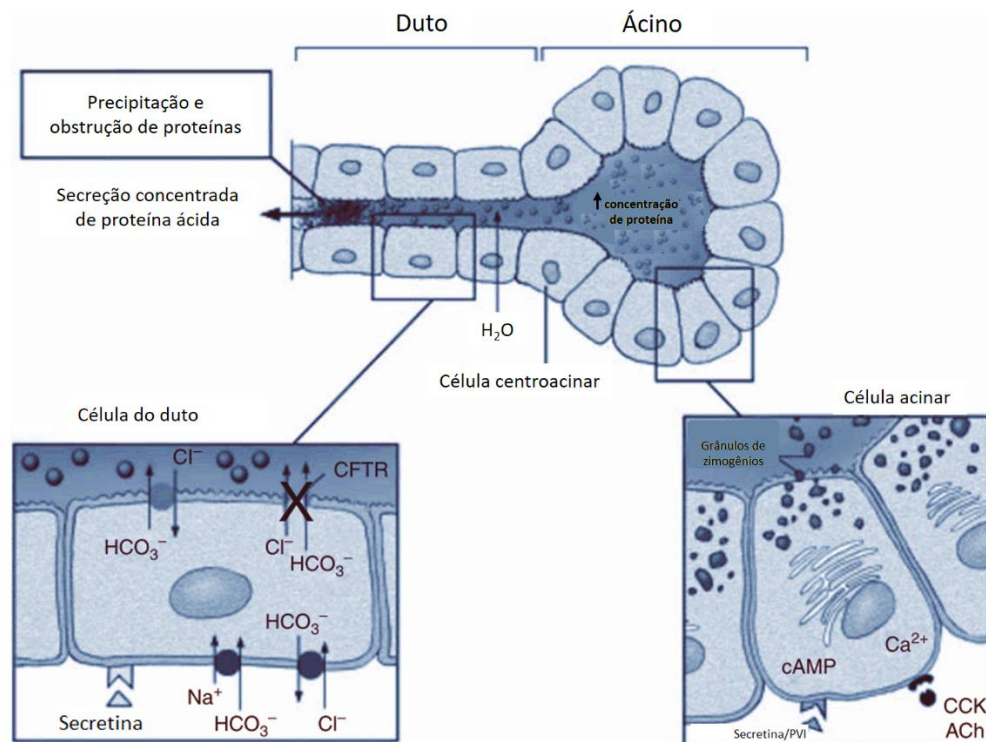


Figura 4. Patogênese da doença pancreática na FC. As células acinares secretam grandes quantidades de proteínas, principalmente na forma de enzimas digestivas, para o lúmen acinar. Em circunstâncias normais, ânions (Cl^- e HCO_3^-) são secretados no lúmen ductal. Isso fornece uma força motriz para o movimento do fluido no lúmen do duto e mantém a solubilidade das proteínas secretadas em uma solução alcalina diluída. Na FC, o transporte aniônico prejudicado para os dutos proximais resulta na diminuição da secreção de líquido mais ácido, o que leva à precipitação de proteínas secretadas. A obstrução intraluminal dos ductos causa dano pancreático progressivo e atrofia. Adaptado de Wilschanski and Novak 2013.

O tripsinogênio, forma precursora da enzima pancreática tripsina, é elevado no recém-nascido com FC. Por isto, a dosagem do tripsinogênio imunorreativo (*immunoreactive trypsinogen* - IRT) em sangue seco no papel filtro, é o pilar da triagem neonatal. Insuficiências pancreáticas (IP) exócrinas graves são detectáveis no nascimento em 60-80% dos recém-nascidos com FC, e causam má absorção de gordura, levando a desnutrição e baixo crescimento (Cipolli *et al.* 2007). A medida de enzimas pancreáticas fecais é utilizada para o diagnóstico exócrino de IP, geralmente medindo a elastase-1 fecal (Daftary *et al.* 2006).

No sistema GI, o comprometimento do intestino devido à perda da função da proteína CFTR começa desde a vida fetal (Castellani e Assael 2017). A secreção de bicarbonato mediada por CFTR é essencial para o tamponamento da acidez gástrica e para permitir a fluidez e hidratação do muco intestinal. A deficiência na proteína CFTR propicia o aparecimento de íleo meconial (obstrução intestinal no recém-nascido) que afeta aproximadamente 20% dos recém-nascidos com FC, sendo frequentemente associado com variantes graves da doença (Castellani e Assael 2017).

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). Pacientes mais velhos podem apresentar constipação e podem desenvolver um quadro suboclusivo ou totalmente oclusivo chamado de síndrome de obstrução intestinal distal (SOID). Sinais de inflamação foram observados em biópsias intestinais, bem como alterada composição do microbioma (Raia *et al.* 2000; Manor *et al.* 2016).

1.2.1.4 Manifestações hepáticas

A CFTR é expressa em células epiteliais do ducto biliar e regula o fluxo biliar independente do ácido biliar. As complicações hepatobiliares são comuns na FC, e afetam cerca de 30 a 50 % dos indivíduos. Há um amplo espectro de doenças hepáticas entre as pessoas com FC, variando de esteatose e colestase neonatal a colelitíase e cirrose multilobular. No entanto, apenas 5 a 10 % das pessoas com FC desenvolvem cirrose relacionada à FC. A doença crônica com cirrose grave e hipertensão portal em pacientes

fibrocísticos é relativamente rara (Sokol e Durie 1999; Rowland *et al.* 2015; Sakiani *et al.* 2019).

A fisiopatologia da doença hepática permanece incerta. A doença hepática avançada é encontrada principalmente em indivíduos com insuficiência pancreática. Até o momento, não há terapias comprovadas para prevenir o desenvolvimento ou progressão da cirrose relacionada à FC (Sakiani *et al.* 2019).

1.2.1.5 Manifestações secundárias

Além das principais manifestações típicas da doença, outras complicações associadas à FC são observadas, como: infertilidade masculina, *diabetes mellitus* relacionado à FC, comprometimento ósseo e câncer gastrointestinal.

A ausência bilateral dos canais deferentes (*congenital bilateral absence of the vas deferens* - CBAVD) é detectada em até 90% dos homens com FC (Yu *et al.* 2012), além de ser encontrada como uma característica clínica isolada em doenças relacionadas com CFTR (Bombieri *et al.* 2011; Castellani e Assael 2017). Trata-se de um defeito de desenvolvimento que bloqueia o transporte de espermatozoides dos testículos ou do epidídimo para os canais deferentes, resultando em azoospermia (Radpour *et al.* 2008; Rogan *et al.* 2011). 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).

Com o aumento da expectativa de vida dos indivíduos fibrocísticos, tem se verificado complicações adicionais relacionadas à doença. A sobrevida média de uma pessoa que nasce com FC hoje é de aproximadamente 50 anos (Scotet *et al.* 2020).

A função pancreática endócrina é geralmente preservada na infância, mas em idades mais avançadas, a destruição progressiva do parênquima e fibrose das ilhotas de *Langerhans* leva a *diabetes mellitus* relacionado à FC (Ntimbane *et al.* 2008). Esta manifestação afeta entre 15 a 30% dos adultos com FC e sua prevalência tende a aumentar com o aumento da expectativa de vida desses pacientes (Balfour-Lynn e King 2020).

O risco de doença óssea está relacionado ao comprometimento do trato GI, e consequente desnutrição, absorção reduzida de vitamina D, baixos níveis de vitamina K, além da gravidade da doença pulmonar, e uma variedade de outros fatores, como citocinas inflamatórias circulantes (Shead *et al.* 2007; Robinson *et al.* 2019). O comprometimento ósseo relacionada à FC tem sido observado em função dos recentes aumentos da longevidade. Entre 10 a 15% dos pacientes, aumentando para 50% na doença em estágio avançado, mostram baixa densidade mineral óssea e estão em risco de osteopenia, osteoporose e fraturas vertebrais (Sermet-Gaudelus *et al.* 2011).

Por fim, tornou-se aparente o aumento de casos de indivíduos fibrocísticos com câncer, principalmente os gastrointestinais, como o câncer colorretal (Maisonneuve *et al.* 2013; Yamada *et al.* 2018; Anderson *et al.* 2019). Estudos de triagem endoscópica de pacientes adultos com FC descobriram que os pólipos em indivíduos com FC apareceram mais cedo e foram maiores e mais agressivos do que aqueles na população sem FC (Billings *et al.* 2014; Niccum *et al.* 2016). Como resultado desses estudos, as diretrizes para triagem endoscópica de pacientes com FC foram modificadas (Hadjiliadis *et al.* 2018).

1.3 Do gene *CFTR* à proteína CFTR

1.3.1 Características do gene *CFTR*

O gene denominado Regulador da Condutância Transmembranar da Fibrose Cística - *CFTR* (GeneID: 1080) causador da FC, está localizado no *locus* 7q31.2 do braço longo do cromossomo 7 (Rommens *et al.* 1989; Riordan *et al.* 1989), apresenta 27 éxons e está distribuído ao longo de aproximadamente 190 kb de DNA genômico (RefSeq: NG_016465.4). Após a transcrição e processamento, é obtido um RNAm maduro de cerca de 6,2 kb (NM_000492.4) que é traduzido em uma proteína composta por 1.480 aminoácidos com massa molecular de 180 kDa (**Figura 5**) (Knowlton *et al.* 1985; Lima Marson *et al.* 2014).

1.3.2 Variantes no gene *CFTR*

De acordo com a Base de Dados de Mutações da Fibrose Cística (“Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1)” – disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>), há mais de 2.100 variantes listadas, incluindo *missense, frameshift, splicing, nonsense, in frame in/del, large in/del e promoter*, sendo variáveis quanto à distribuição ao longo do gene e frequência de acordo com a distribuição geográfica e etnia (**Figura 5**) (Bobadilla *et al.* 2002; Castellani *et al.* 2008; Cutting 2015; Pereira *et al.* 2019). Algumas variantes predispõem a maior gravidade clínica. Segundo o último relatório do “*Clinical and Functional Translational of CFTR*”, 360 variantes já foram anotadas como causadoras da FC (disponível em <https://cftr2.org>).

A maior parte destas variantes são mais raras, à exceção da p.Phe508del (c.1521_1523delCTT, F508del) (disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca>) que

consiste na deleção do códon 508 (CTT) na sequência da proteína o que leva a não incorporação de uma fenilalanina durante a síntese proteica (Cutting 2015). Essa alteração de sequência, que ocorre no éxon 11, é responsável pela deficiência no dobramento da proteína, resultando, posteriormente, na degradação da mesma pelo retículo endoplasmático. A variante p.Phe508del é em homozigose, bem como em heterozigose composta, a variante com maior frequência populacional, independente da faixa etária estudada (Bieger *et al.* 2012; Tsui e Dorfman 2013; Bonadia *et al.* 2014). Aproximadamente, 70% dos alelos de pacientes com FC, em todo o mundo, apresentam essa variante (acessado em 01 de novembro de 2020, disponível em https://cftr2.org/mutations_history).

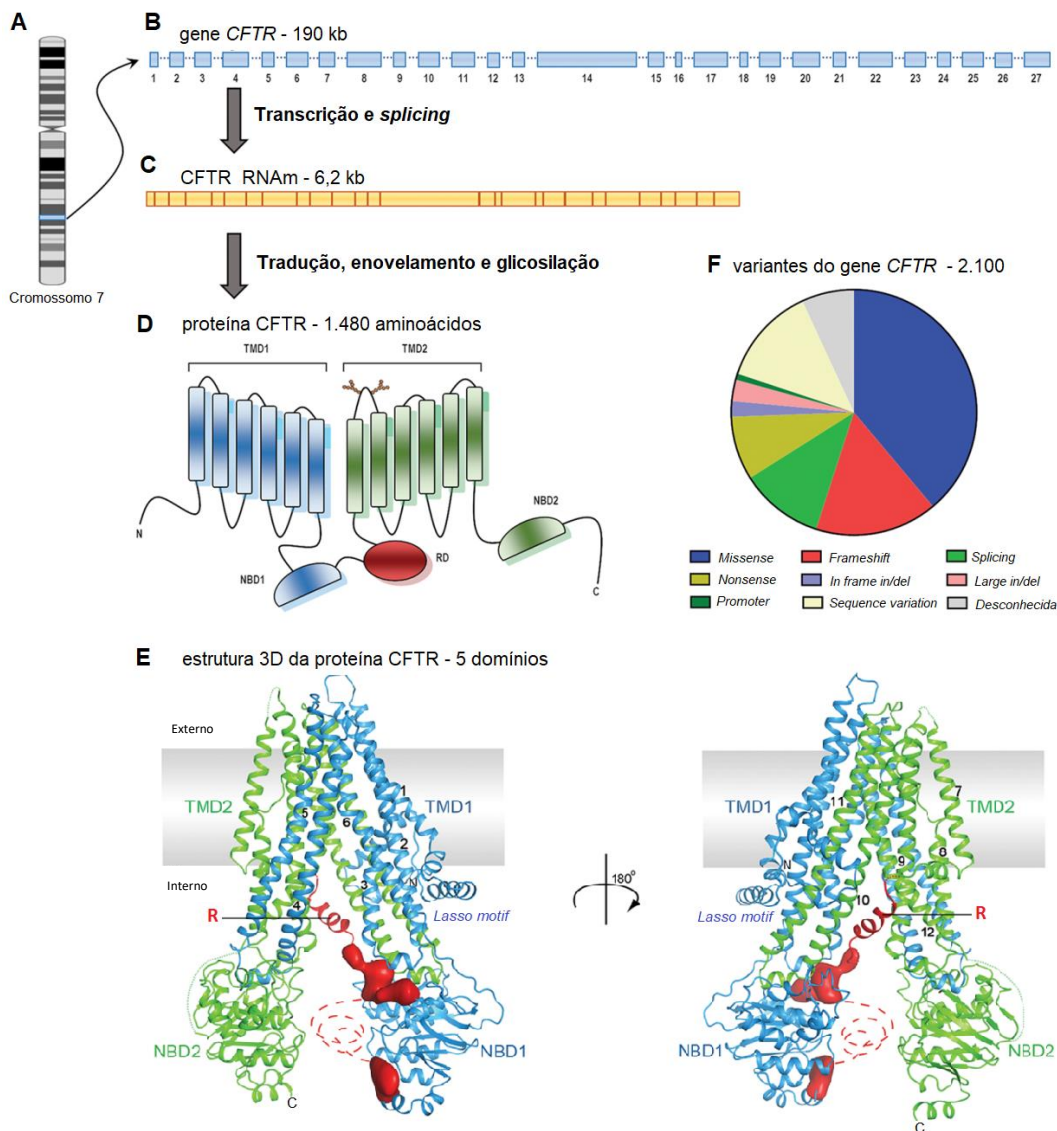


Figura 5. Esquema com a representação do gene à estrutura da proteína. (A) O gene *CFTR* está localizado no braço longo do cromossomo 7. (B) O gene contém 27 exons e abrange aproximadamente 190 kb de DNA genômico humano. (C) O RNAm tem 6,2 kb de comprimento, incluindo as regiões não traduzidas. (D) A proteína *CFTR* forma um canal de cloreto composto por cinco domínios: dois domínios transmembrana (TMD1 e TMD2), dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) e um domínio regulatório (R). (E) A estrutura geral da proteína *CFTR* humana na conformação desfosforilada, livre de ATP. (F) As 2.100 variantes do gene *CFTR* até agora relatadas consistem em variantes *missense* (38,77%), *frameshift* (16,27%), *splicing* (10,94%), *nonsense* (8,42%), *in frame in/del* (2,05%), *large in/del* (2,81%), *promoter* (0,81%), variantes possivelmente não patogênicas (12,80%) e variantes de significado desconhecido (7,14%). Adaptado do banco de dados *CFTR*, acessado em 01 de novembro de 2020. Adaptado de Lopes-Pacheco 2020.

1.3.3 Características da proteína CFTR

A proteína CFTR pertence à família de transportadores de membrana acoplados a ATP (ATP- *binding cassette*- ABC), sendo composta por 1.480 aminoácidos (NP_000483.3)(MacDonald *et al.* 2007).

A proteína consiste em um canal de cloreto (Cl⁻) dependente de adenosina monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate* - cAMP) e ATP com duas metades simétricas (Rowe *et al.* 2005; Liu *et al.* 2017; Anderson *et al.* 2019). É composta por cinco domínios proteicos: dois domínios transmembrânicos hidrofóbicos (*transmembrane domains* - TMD1 e TMD2), cada um com seis subunidades que formam o poro do canal; dois domínios citoplasmáticos de interação com nucleotídeo (*nucleotide binding domains* - NBD1 e NBD2), responsáveis pela ligação e hidrólise de ATP e um único domínio regulador citoplasmático (*regulator domain* - R) que contém múltiplos sítios de fosforilação para cinases (**Figura 5**) (Kirk and Wang 2011; Cutting 2015; Liu *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017). Além disso, a CFTR também contém um motivo citoplasmático de ligação ao PDZ (PSD95, DlgA e zo-1) na região C-terminal. Esta região interage com proteínas contendo PDZ envolvidas na regulação do citoesqueleto de actina e sinalização intracelular (Jakab *et al.* 2011; Anderson *et al.* 2019). Neste canal, ambas as extremidades N-terminal e C-terminal da proteína CFTR estão voltadas para o citoplasma (Cutting 2015).

A seletividade do canal a ânions pode ser alterada pela presença de variantes em sítios específicos dentro dos domínios TMDs (Welsh e Smith 1993; Linsdell 2017; Liu *et al.* 2017). A atividade é modulada pelo domínio regulador R, podendo ter um efeito inibitório ou estimulatório (Linsdell 2017; Zhang *et al.* 2017). Os domínios NBDs da proteína são responsáveis por fornecerem a energia necessária para a atividade do canal pela ligação e hidrólise do ATP (Linsdell 2017; Zhang *et al.* 2017). Em condições normais, a proteína

CFTR é regulada positivamente por fosforilação do domínio R. Diversas proteínas podem desempenhar esta função como proteína tirosina cinase (*protein tyrosine kinases* - PTKs), proteína cinase C (*Protein kinase C* - PKC) e a proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico (*Cyclic guanosine monophosphate* - cGMP). Porém, essa 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. Todo o processo de abertura e fechamento do canal é apropriadamente denominado canal "gating" (Gadsby *et al.* 2006; Hwang e Sheppard 2009; Liu *et al.* 2017; Chen *et al.* 2019).

A proteína CFTR é localizada na membrana apical das células epiteliais dos pulmões, intestino, pâncreas, tecidos reprodutivos e glândulas exócrinas, auxiliando no controle da quantidade de água no meio extracelular (Cutting 2010; Lubamba *et al.* 2012; Scott *et al.* 2020; Chamayou *et al.* 2020).

Além de atuar como um canal de Cl^- , a CFTR também funciona como um regulador de condutância, exercendo assim, influências modulatórias sobre outros canais iônicos (Na^+ , K^+ , Ca^+ e outros canais de Cl^-), sobre o transporte de proteínas e sobre processos como mecanismos de liberação de ATP, produção de óxido nítrico, regulação de secreção de bicarbonato, entre outros (Guggino e Stanton 2006; Linsdell 2017; Liu *et al.* 2017; Anderson *et al.* 2019).

Dependendo do tecido em que é expressa, a CFTR tem uma função diferente (McCarthy e Harris 2005; Lucarelli *et al.* 2012; Wang *et al.* 2014; Cutting 2015). No tecido

epitelial do intestino e das vias aéreas, o canal secreta Cl^- para o lúmen (**Figura 6**), diferentemente das glândulas sudoríparas em que atua reabsorvendo o ânion (**Figura 7**). Ainda, a CFTR tem uma função adicional nos pulmões de regular o transporte de Na^+ ao interagir com o canal de sódio epitelial (ENaC) (Lucarelli *et al.* 2012; Cutting 2015).

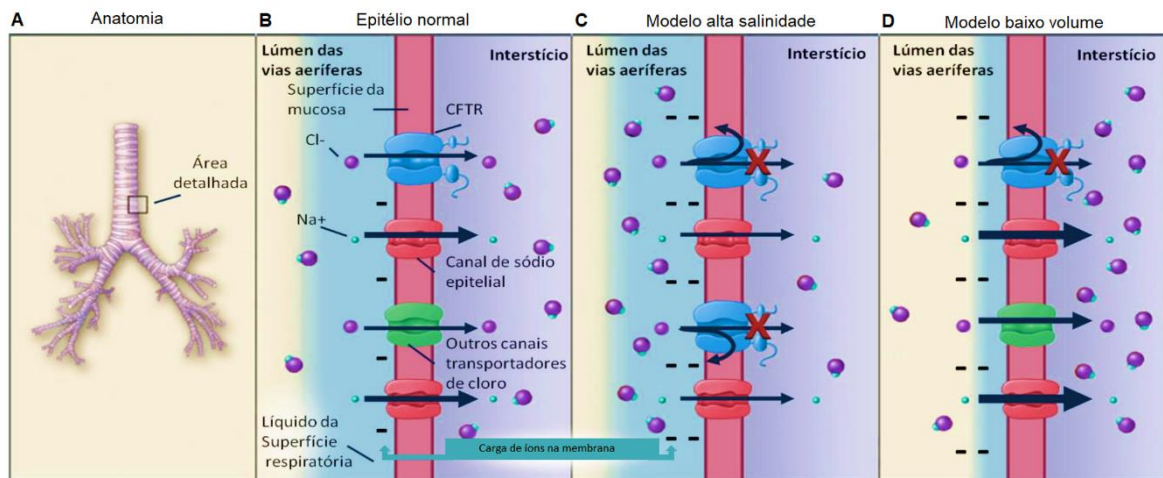


Figura 6. Painéis de modelos para explicar a diferença de potencial transepitelial do epitélio das vias aéreas na FC. Em condições normais, o NaCl é absorvido nas vias aéreas (Painel A). O primeiro passo desse processo ocorre por vias de absorção de Na^+ e Cl^- na superfície das membranas das células epiteliais das vias aéreas (Painel B). Em um ensaio bioelétrico, o lúmen é negativo, em parte devido a impermeabilidade relativa de Cl^- , em comparação com o Na^+ . A contribuição relativa da CFTR e outras vias de permeabilidade Cl^- não é conhecida. A diferença de potencial transepitelial é marcadamente hiperpolarizada (ou seja, o lúmen é mais carregado negativamente) na FC. Dois modelos têm sido propostos para explicar essa diferença. No modelo de alta salinidade (Painel C), a situação se assemelha ao do ducto de suor, em que a ausência da CFTR leva à incapacidade de absorver íons Cl^- do líquido de superfície das vias aéreas. Por causa da atividade contínua de reabsorção de íons de Na^+ , que é dependente de canais de sódio epitelial, a negatividade de superfície das vias aéreas é aumentada. No modelo de baixo volume (Painel D), ambos, Na^+ e Cl^- , são hiperabsorvidos. As vias aéreas dos pacientes com FC são ligeiramente menos permeáveis aos íons Cl^- do que aos íons de Na^+ , um processo que leva a diferença de potencial transepitelial aumentado. Este modelo prevê diminuição no volume de líquido da superfície das vias aéreas (em azul). A espessura das setas corresponde ao grau de movimento de íons. Adaptado de Rowe *et al.* 2005.

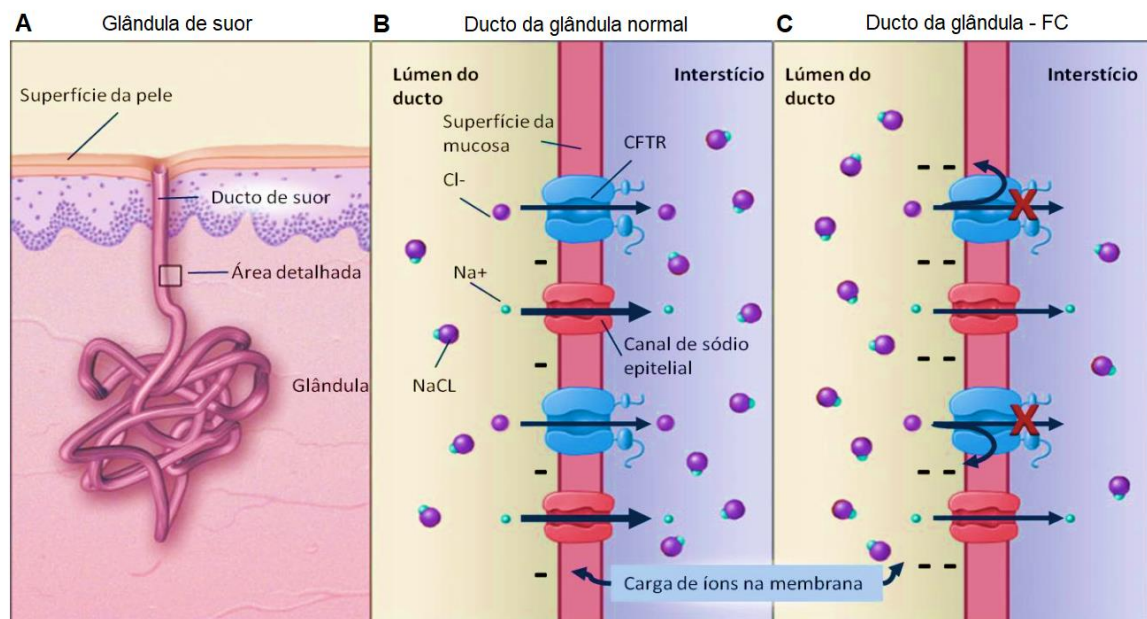


Figura 7. Painéis com esquema dos mecanismos associados aos níveis elevados de NaCl no suor de pacientes com FC. Ductos de suor (Painel A) em pacientes com FC diferem daqueles em pessoas sem a doença na capacidade de reabsorção de Cl^- antes do suor ser liberado na superfície da pele. A principal via de absorção de Cl^- é através da proteína CFTR, situado dentro de membrana plasmática do lúmen das células que revestem o ducto (Painel B). A diminuição da reabsorção de íons cloreto e a alteração no transporte de sódio levam a diferença de potencial transepitelial elevada por todo ducto de suor, e a luz se torna carregada negativamente devido à falha de reabsorver Cl^- (Painel C). O resultado é que o fluxo de NaCl total diminui acentuadamente, levando ao teor de sal aumentado. A espessura das setas corresponde ao grau de movimento de íons. Adaptado de Rowe *et al.* 2005.

1.3.4 Diferentes mecanismos moleculares de disfunção da CFTR na FC: classes das variantes

Atualmente, mais de 2.000 variantes já foram identificadas ao longo de todo o comprimento do gene *CFTR* (disponível em <http://www.genet.sickkids.on.ca>). A grande variedade de tipos de variantes foi recentemente dividida em sete classes (classe IA, IB, II, III, IV, V, VI), de acordo com o mecanismo pelo qual afetam a expressão qualitativa e quantitativa da proteína CFTR, de acordo com a disponibilidade/aplicabilidade da medicina de precisão e de acordo com a gravidade da doença (**Figura 8**) (Marson *et al.* 2016, 2017). Nesta classificação, as classes IA, IB, II e III são consideradas variantes mais graves, pois ocasionam a ausência da proteína CFTR ou a produção da proteína não funcional. Já as

variantes das classes IV, V e VI estão associadas aos fenótipos mais moderados, com melhor prognóstico, devido ao fato de que existe a ação funcional da proteína CFTR, mesmo que em baixa quantidade (Marson *et al.* 2016, 2017; Wagener *et al.* 2018).

Na Classe IA, há a ausência da transcrição do RNAm e como resultado, ausência da síntese da proteína CFTR funcional. Nela estão representadas as variantes chamadas “não recuperáveis”, porque não podem ser recuperadas farmacologicamente - por exemplo, grandes deleções como a variante c.54-5940_273+10250del21kb ou CFTRdele2,3 (deleção de 21kb) (De Boeck e Amaral 2016; Marson *et al.* 2016, 2017). De Boeck e Amaral 2016, nomearam esta classe como Classe VII, porém, em 2016, Marson e colaboradores sugerem que pelo fato das variantes de classe VII terem o mesmo resultado que as variantes de classe I - ou seja, ausência da proteína CFTR , e sem possibilidade de resgate por terapia corretiva, deveriam ser enquadradas como classe IA (Marson *et al.* 2016). O esquema de classificação sugerido por De Boeck e Amaral é importante para melhorar o desenvolvimento de novos medicamentos. Contudo, para Marson, a classificação deve levar em consideração a gravidade clínica das variantes *CFTR* (Marson *et al.* 2016). No sistema de classificação proposto por De Boeck, a classe VII está sendo proposta como a última classe de variante em termos de ordem numérica, porém está relacionada às classes I, II e III mais graves.

Na Classe IB, a proteína CFTR funcional também não é presente. Variantes desta classe incluem principalmente: *nonsense* (que geram um códon de terminação prematuro UAA, UAG ou UGA- *premature termination codon*, PTC) e *frameshift* (deslocam a fase aberta de leitura). Ao contrário da classe anterior, as variantes da Classe IB podem ser corrigidas pela ação de novos fármacos (medicina de precisão). Dois exemplos desta classe são p.Gly542X e p.Trp1282X (Marson *et al.* 2016, 2017).

As variantes de classe II afetam o tráfego da proteína CFTR, resultado do dobramento incorreto da proteína e retenção no retículo endoplasmático (RE) pelo mecanismo de controle de qualidade do RE. Essa retenção é seguida por marcação de ubiquitina e por degradação prematura pelo proteassomo presente no citosol, o que impede a proteína de trafegar para a superfície da célula, reduzindo severamente a sua função (Faria *et al.* 2014; De Boeck e Amaral 2016; Marson *et al.* 2016, 2017). A variante p.Phe508del, mais frequente em todo o mundo, está incluída nessa classe.

A Classe III engloba as variantes que comprometem a regulação do canal Cl⁻, pois o domínio regulador (R) da proteína ou os domínios de ligação aos nucleotídeos (NBD) estão acometidos. Com isso, a proteína é produzida e posicionada na membrana plasmática normalmente, porém, o canal não responde ao estímulo do AMP cíclico (cAMP), incapacitando o processo de abertura e consequente função normal da CFTR (Veit *et al.* 2016; Marson *et al.* 2017). Exemplos dessa classe incluem p.Gly551Asp, p.Gly1349Asp, p.Gly551Ser e p.Ser549Asn.

Na Classe IV, encontram-se, geralmente, variantes *missense* que estão localizadas principalmente nos domínios TMDs, ocasionando uma diminuição substancial na condutância e tempo de abertura do canal (Zielenski e Tsui 1995; De Boeck e Amaral 2016). Alguns exemplos de variantes dessa classe são: p.Arg117His, p.Gly314Glu, Ala455Glu, Arg334Trp (De Boeck e Amaral 2016; Marson 2018).

As variantes da Classe V geram uma grande redução nos níveis de proteína CFTR normal. Nessa classe, se incluem variantes na região promotora que reduzem a transcrição do gene e variantes que promovem *splicing* alternativo de transcritos. Exemplos: c.3140-

26A>G, c.3718-2477C>T, p.Ala455Glu, c.2657+5G>A (Marson *et al.* 2016; Lopes-Pacheco 2020; De Boeck 2020).

Por fim, a Classe VI é definida com variantes *nonsense* e *frameshift* que reduzem a estabilidade conformacional, acelerando o *turnover* e diminuindo a expressão da proteína na membrana plasmática apical (Veit *et al.* 2016; Marson *et al.* 2017; De Boeck 2020). Exemplos: p.Cys1400X, p.Gln1412X, p.Ile1383AsnfsX3 ou c.4147_4148insA .

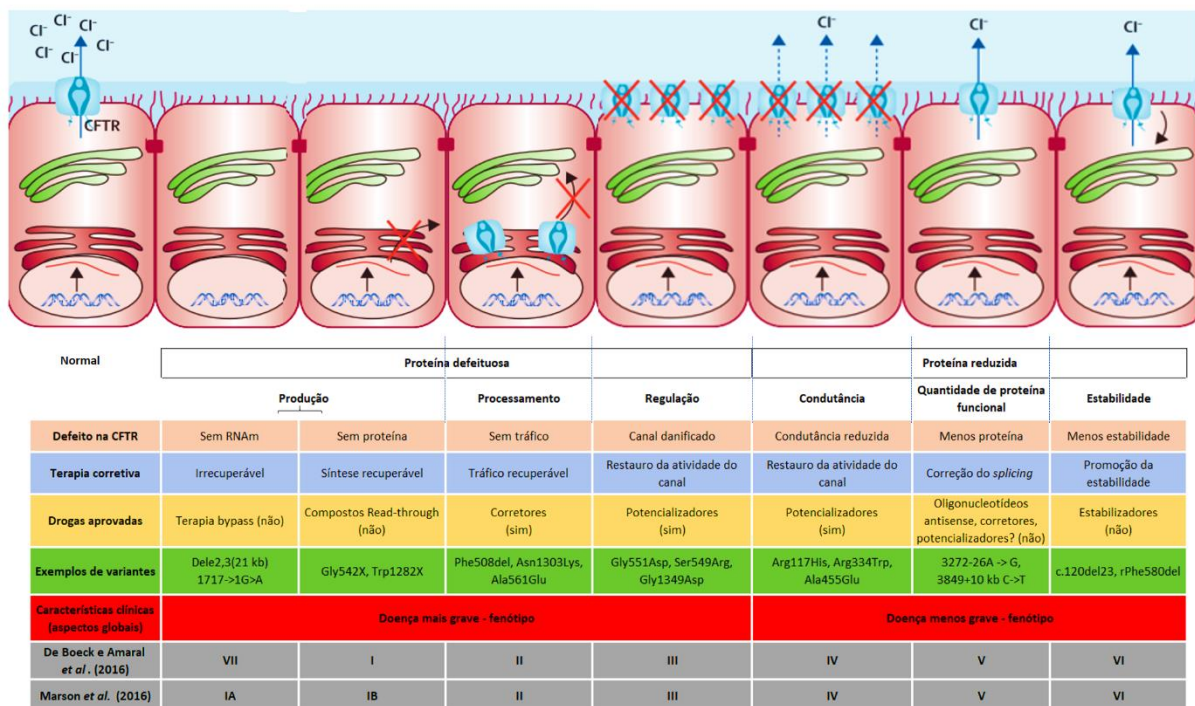


Figura 8. Mecanismos da proteína CFTR desde a transcrição até a ancoragem na superfície celular, até o funcionamento. A proteína CFTR defeituosa é produzida nas classes I, II, III e IV. A função reduzida da proteína CFTR é encontrada nas classes V e VI. Classe I: sem produção de CFTR (IA, sem RNAm; IB, sem proteína). Classe II: erro de processamento da CFTR. A proteína CFTR é degradada no retículo endoplasmático. Classe III: regulação da proteína CFTR com o defeito. Mutações CFTR relacionadas à expressão do domínio R. Classe IV: a condução é alterada por mutações nos domínios que abrangem a membrana. Classe V: quantidade reduzida de proteína CFTR na superfície celular. No entanto, a atividade normal está presente. Classe VI: baixa estabilidade da função CFTR. A marcação (X) indica a ausência de proteína CFTR por um códon de parada prematuro (classe I), ausência de proteína CFTR na superfície da célula (classe II) ou ausência de função CFTR (classe III); setas azuis contínuas indicam transporte normal de cloreto; setas azuis não contínuas indicam transporte de cloreto residual. O número de proteínas CFTR na superfície celular está relacionado à expressão do gene *CFTR*. Além disso, há uma breve descrição do defeito na CFTR, exemplos de mutações, terapia corretiva (disponibilidade), medicamentos e características clínicas. Ainda, é mostrada as classificações de variantes *CFTR* propostas por De Boeck e Amaral (2016) e uma nova classificação por Marson e colaboradores (2016). Adaptado de Marson *et al.* 2016; Marson 2018; De Boeck 2020.

1.4 Variabilidade na correlação entre fenótipo-genótipo: diferentes aspectos relacionais

A FC, por ser uma doença recessiva, requer a presença de variantes em ambos os alelos no gene *CFTR*. Portanto, a classe e as consequências moleculares da segunda variante na atividade proteica determinam a função residual da proteína, e por consequência, o resultado clínico do paciente. Por exemplo, um alelo com uma variante grave está associado a IP apenas se a segunda variante for grave; por outro lado, uma variante leve é suficiente para preservar a função pancreática, independentemente da classe do segundo alelo (Zielenski 2000; De Boeck 2020) (**Figura 9**).

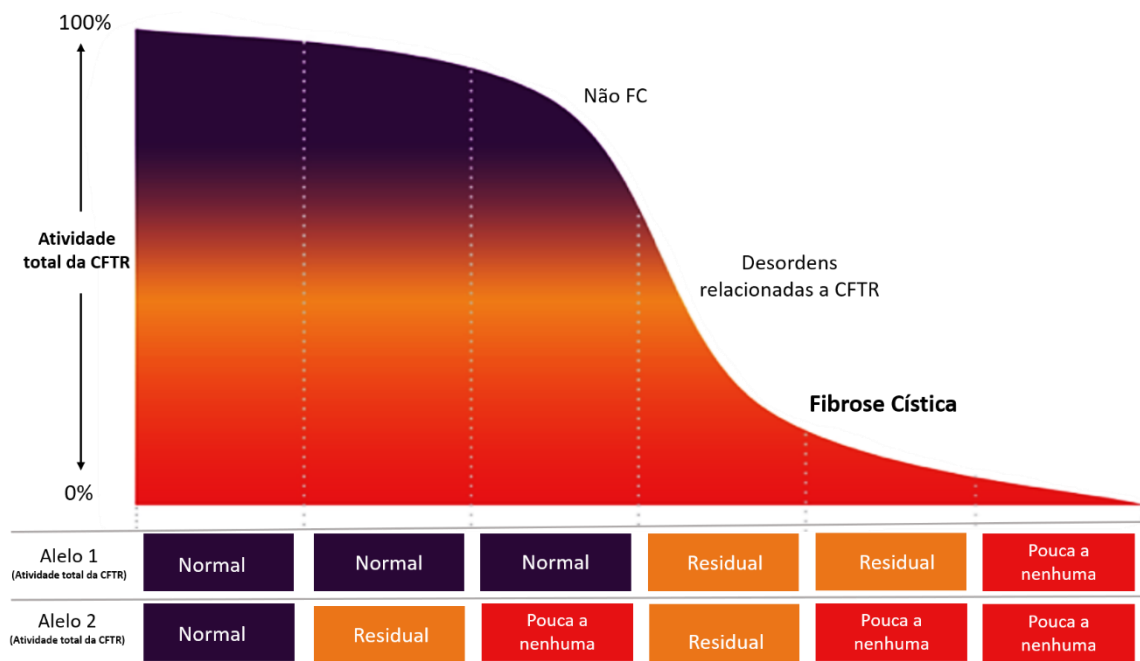


Figura 9. Espectro de fenótipos associados ao gene *CFTR*. A gravidade dos fenótipos associados a *CFTR* reflete o espectro dos genótipos *CFTR*. Há uma sobreposição entre a FC atípica e as apresentações clássicas da FC em subconjuntos de pacientes com doenças monossintomáticas, como CBAVD, pancreatite idiopática ou bronquiectasia difusa, que podem receber um diagnóstico secundário de FC muito leve. Alguns portadores de variantes no *CFTR* podem ter maior susceptibilidade a certas condições pulmonares (por exemplo, asma). Adaptado de Zielenski 2000 e Vertex Pharmaceutical Incorporated 2018.

Ademais, embora a FC seja considerada uma doença monogênica, sabe-se que a correlação entre o genótipo e a expressão da doença é influenciada por vários outros fatores

(epigenéticos, ambientais e genes modificadores) que fazem com que a variabilidade do fenótipo se estenda ao longo de um amplo espectro (Gallati 2014; Castellani e Assael 2017; Marson 2018) (**Figura 10**). Devido a isso, o resultado pulmonar é clinicamente o mais variável, bem como o componente mais imprevisível do fenótipo da FC (Gallati 2014; Corvol *et al.* 2015). Estudos focando o estado pulmonar com a variante p.Phe508del, relataram uma ampla gama de efeitos, desde um impacto detectável no fenótipo até nenhuma influência ou influências estatisticamente insignificantes (Kraemer *et al.* 2009; Cutting 2010; Weiler e Drumm 2013).

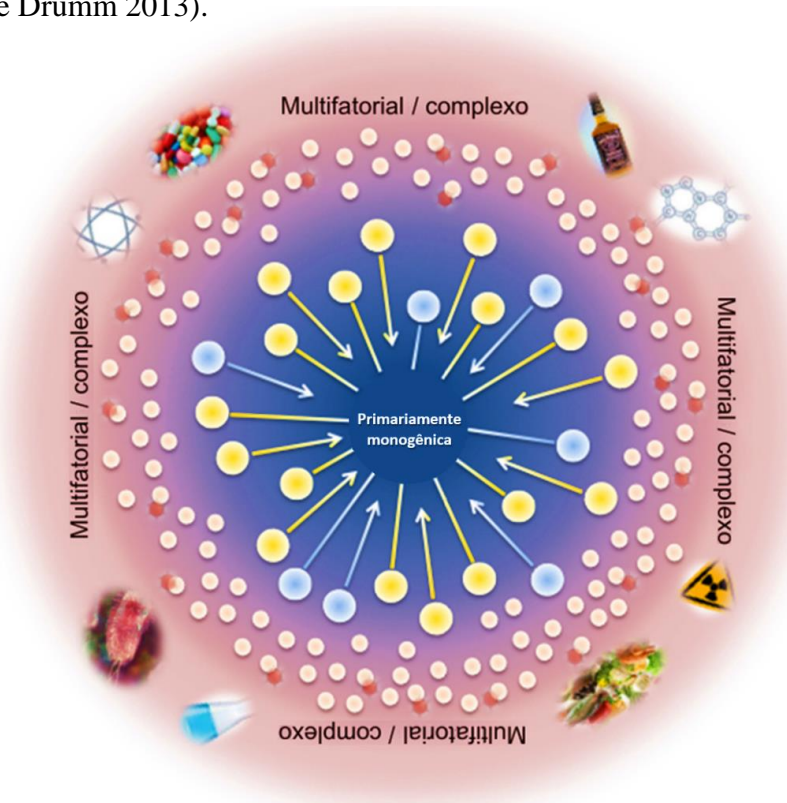


Figura 10. Esquema da relação entre genótipo e fenótipo, e a influência de fatores adicionais, como genes modificadores, toda a base genética, epigenética e efeitos ambientais sobre a fibrose cística. Notas: Em doenças principalmente monogênicas, o fenótipo é significativamente definido pelas variantes causadoras da doença, enquanto os genes modificadores diretos e indiretos seguidos por todo o histórico genético, epigenética e ambiente essencialmente induzem a variabilidade fenotípica. As doenças multifatoriais e complexas, entretanto, são em grande parte o resultado de uma ou várias predisposições genéticas desencadeadas por fatores exógenos. Os círculos amarelos representam modificadores que aumentam a gravidade da doença CFTR e os círculos azuis representam modificadores com um efeito protetor contra CFTR. Os círculos bege representam o fundo genético e as formas vermelhas mostram a metilação de genes específicos (influências epigenéticas). Os modificadores diretos são mostrados sem uma ponta de seta e os modificadores indiretos com uma ponta de seta. Uma gama de efeitos ambientais (por exemplo, produtos químicos, clima, drogas, infecções, radiação) são mostrados no círculo externo. Adaptado de Gallati 2014.

Esses e outros estudos apontam para o entendimento que um genótipo do *CFTR* constitui apenas a fonte ou um potencial para a doença, que em vários graus será expressa e traduzida em fisiopatologia da FC (Gallati 2014). Assim, estudos clássicos de genótipo-fenótipo são importantes, mas não suficientes, e devem ser complementados pela busca de efeitos genéticos ambientais e outros genes no fenótipo clínico, a fim de aumentar o conhecimento dos mecanismos da doença e desenvolver novas abordagens diagnósticas e terapêuticas (Lopes-Pacheco 2020; De Boeck 2020).

1.5 Diagnóstico

A doença possui um amplo espectro de manifestações clínicas, causadas pelo elevado número de variantes e seus mecanismos sobre a proteína CFTR, somado ao comportamento multissistêmico. Estes fatores fazem com que o diagnóstico precoce da FC, ainda na infância, seja um desafio. Este diagnóstico é de extrema importância, pois pode retardar a insuficiência pancreática, prevenir a desnutrição e permitir um tratamento rápido das infecções pulmonares, minimizando os danos permanentes ao pulmão, melhorando assim, o prognóstico e a qualidade de vida do paciente (Castellani e Massie 2010; Elborn 2016; De Boeck *et al.* 2017).

Diante disso, os programas de triagem neonatal implantaram o diagnóstico da FC em todo o mundo (Castellani *et al.* 2018; Bell *et al.* 2020). No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) implementou a Triagem Neonatal, popularmente conhecida como Teste do Pezinho, em janeiro de 1992 sob a portaria GM/MS nº22. Em junho de 2001, foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pelo Ministério da Saúde sob a portaria GM/MS nº822, com o objetivo de atender a todos os recém-nascidos em território brasileiro, com

uma implantação progressiva no país, de acordo com as condições estruturais e operacionais de cada estado, sendo a FC incluída na fase III do programa (disponível em <https://www.gov.br>).

O fluxograma da triagem neonatal de FC utilizado no Brasil pelo SUS, baseia-se em duas dosagens dos níveis de tripsinogênio imunorreativo (*immunoreactive trypsinogen - IRT*), sendo a primeira entre o terceiro e o quinto dia pós-natal, e a segunda realizada dentro de 30 dias de vida. Se a triagem for positiva (ou seja, duas dosagens positivas), o teste do suor é realizado para confirmar ou descartar a FC. Concentrações de cloreto no suor ≥ 60 mmol/L (teste do suor), medidas por métodos quantitativos, em duas amostras, confirmam o diagnóstico. Em casos de valores limítrofes (30-59 mmol/L) é realizado a genotipagem do gene *CFTR* (Athanzio *et al.* 2017; Bell *et al.* 2020).

Essa análise molecular, auxilia no prognóstico e na epidemiologia da doença, permitindo a identificação de portadores de alelos para FC e a predição de variantes no gene *CFTR*. A detecção da presença de duas ou mais variantes, em alelos diferentes, confirma o diagnóstico de FC, podendo o indivíduo ser portador de uma mesma variante nos dois alelos (homozigoto) ou portador de duas variantes diferentes no *CFTR* (heterozigoto composto). No entanto, o achado de uma única variante (heterozigoto) deve ser associado à confirmação de disfunção da CFTR, além de manifestações clínicas compatíveis com FC. A não detecção de variantes não exclui o diagnóstico (Chmiel *et al.* 1999; Gallati 2014; Athanzio *et al.* 2017). Entretanto, ainda existe grande heterogeneidade entre as diferentes regiões do Brasil no que diz respeito ao acesso dos pacientes aos métodos diagnósticos e terapêuticos (Athanzio *et al.* 2017).

No estado do Rio Grande do Sul, a identificação pelo SUS também ocorre pela dosagem de IRT, seguida pelo teste do suor. No entanto, além destes testes, é realizada a análise molecular da variante p.Phe508del (a mais prevalente entre os pacientes com FC), bem como um painel com as 11 variantes mais frequentes no estado (**Figura 11**) (Rispoli *et al.* 2018).

Atualmente existem testes comerciais disponíveis, os quais são capazes de detectar entre 25 a 35 diferentes variantes e o sequenciamento do gene *CFTR*. Entretanto, esses testes possuem dois pontos negativos: elevado custo, sendo inacessível sua implementação pelo SUS e por consequência à maior parte da população brasileira; e os seus alvos, que são as variantes recomendadas pela *American College of Medical Genetics* (ACMG) com frequência mundial (Richards *et al.* 2015), podendo não corresponder aos melhores alvos para populações específicas.

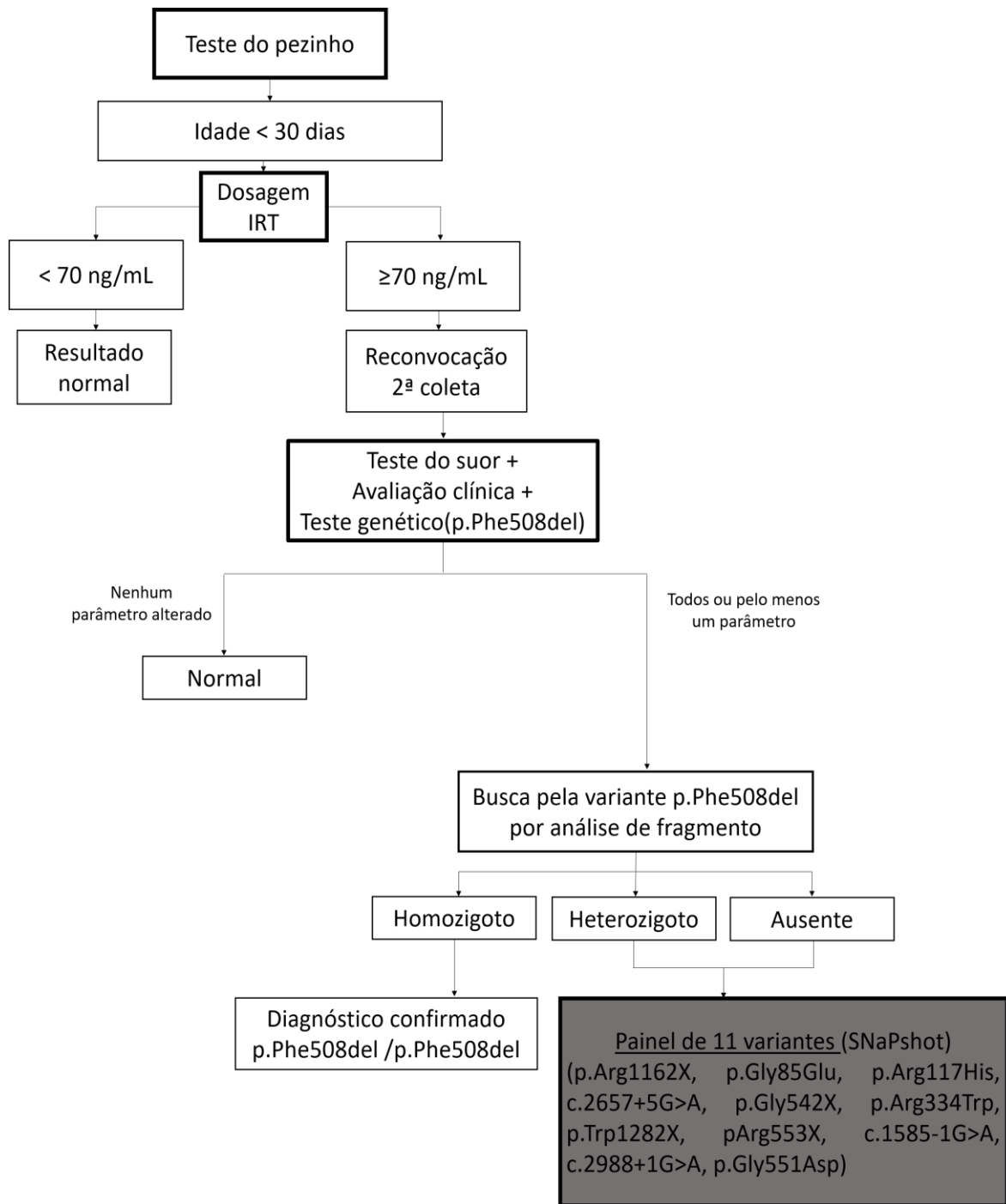


Figura 11. Representação do fluxograma da triagem neonatal realizada no estado do Rio Grande do Sul. As caixas brancas representam a verdadeira triagem genética para fibrose cística no Brasil. Nossa estratégia SNaPshot como rastreamento complementar para fibrose cística está localizada na caixa preta. Adaptado de Rispoli *et al.* 2018.

1.6 Cuidados com a FC: tratamento

O manejo clínico em pacientes com fibrose cística depende de equipes multidisciplinares especializadas para garantir que todos os aspectos da doença sejam gerenciados de forma eficaz (Kerem e Webb 2014; Elborn 2016). Este processo tem sido auxiliado por padrões nacionais e internacionais de atendimento e diretrizes que possibilitam a avaliação do desempenho dos Centros de Referência em Fibrose Cística, impulsionando a cultura de alta qualidade (Kerem e Webb 2014). Ademais, a maioria dos países possui um Registro de FC que permite a comparação ano a ano, bem como a oportunidade de comparar centros com recursos e geografia semelhantes (Elborn 2016; Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2017).

Atualmente, o tratamento dos pacientes com FC pode ser realizado com base na sintomatologia pela medicina personalizada (**Tabela 1**), bem como o uso de medicina de precisão.

Medicina personalizada é o termo utilizado para o tratamento com foco no paciente a partir de sua caracterização clínica individual, considerando a diversidade de sintomas, gravidade e características genéticas. Assim, a medicina personalizada é realizada na FC e em muitas outras doenças, com base nos sintomas dos pacientes. Um exemplo clássico é o uso de suplementação de enzimas digestivas na FC. A dose é ajustada, não apenas por causa das características fisiológicas do paciente, mas considerando a resposta à enzima, volume de alimento ingerido, tipo de alimento ingerido, número de refeições, ganho de massa corporal, taxa de crescimento e tipo de enzima uso (Sathe e Freeman 2016; Marson *et al.* 2017; Castellani e Assael 2017).

Esta abordagem terapêutica muitas vezes desconsidera ou simplifica nuances genéticos do paciente, não sendo considerada uma medicina da era genômica. Uma

utilização consistente de determinados medicamentos, ao longo prazo, pode ocasionar problemas secundários, como a resistência aos antibióticos (Samson *et al.* 2016; Rutter *et al.* 2017).

Tabela 1. Lista de tratamentos e intervenções médicas empregados na FC

Tratamento	Frequência	Alvo	Propósito
Fisioterapia	Diariamente*	Sistema respiratório	Fisioterapia pulmonar para ajudar os pacientes a expectorar e melhorar a depuração mucociliar das vias aéreas.
Terapia de reposição enzimática regularmente	Regularmente	Trato gastrointestinal	Ajuda a superar alguns dos problemas trato associado a insuficiência pancreática.
Inibidores da Bomba de Próton (IBP) e antieméticos	Conforme necessário	Trato gastrointestinal	Freqüentemente usado para ajudar a aliviar a indigestão e dor no estômago e também nas náuseas, que podem ser um efeito colateral de outros medicamentos.
Antibióticos	Conforme necessário - Regularmente	Sistema respiratório	Para reduzir a infecção microbiana e a colonização no pulmão.
Terapia osmótica	Diariamente*	Sistema respiratório	A solução salina hipertônica é geralmente nebulizada como uma névoa salina estéril. Manitol, administrado como um pó seco, também demonstrou melhorar a função pulmonar.
Broncodilatadores	Regularmente	Sistema respiratório	Antagonistas do receptor B-adrenérgico (de ação rápida e longa duração) são comumente usados para abrir as vias aéreas em pacientes responsivos e antes das sessões de fisioterapia para ajudar na expectoração dos pacientes. Drogas anticolinérgicas são menos comumente usadas.
Corticóides	Conforme necessário	Sistema respiratório	Usado para melhorar a inflamação aguda das vias aéreas.
Antinflamatórios não esteróides	Diariamente*	Sistema respiratório	Há evidências de que o uso a longo prazo de medicamentos inflamatórios ibuprofeno pode ajudar a retardar a deterioração da função pulmonar ao longo do tempo, e a Cystic Fibrosis Foundation recomenda seu uso.
Agentes mucolíticos	Diariamente*	Sistema respiratório	Pulmozyme®, ou alfa-dornase, é uma enzima DNase recombinante humana comercializada pela Genentech e é o principal agente mucolítico usado por pessoas com FC. O DNA extracelular (humano e microbiano) é um dos componentes do muco espesso e pegajoso encontrado nas vias aéreas da FC. A N-acetilcisteína também tem sido usada como agente mucolítico por seus efeitos nas glicoproteínas da mucina.
Tecnologia de reprodução assistida	Raramente	Sistema reprodutivo	A fertilização <i>in vitro</i> , têm sido usada em homens com ausência bilateral congênita dos canais deferentes (CBAVD).
Cirurgia	Uma vez na vida	Sistema respiratório	Os transplantes pulmonares bilaterais são uma opção em alguns pacientes com doença pulmonar grave. A cirurgia de transplante não cura a FC (já que outros órgãos ainda serão afetados) e tem riscos consideráveis, mas pode estender a vida das pessoas com FC que têm função pulmonar muito fraca e pode melhorar a qualidade de vida de alguns.

Pacientes com os fenótipos graves mais comuns terão experimentado muitos, senão a maioria dos tratamentos listados acima durante o curso de suas vidas. A *Cystic Fibrosis Foundation* e outros órgãos avaliam as evidências da eficácia do tratamento coletadas por meio de análises da *Cochrane* e outra literatura científica para informar recomendações para pacientes com FC e suas equipes de apoio (Mogayzel *et al.* 2013). *Tratamentos diários para quem necessita. Adaptado de Fraser-Pitt and O'Neil 2015.

Recentemente, um modelo mais complexo de tratamento, chamado de medicina de precisão, visa ir além da personalização, buscando mecanismos moleculares de tratamento das causas da doença e não apenas tratando os sinais e sintomas clínicos. Nesta nova abordagem terapêutica, a informação molecular maximiza a precisão com que os pacientes são categorizados e tratados (Perlman e Govindaraju 2016; Lopes-Pacheco 2016, 2020).

Novos fármacos, denominados moduladores do CFTR, retificam os defeitos específicos de certas variantes do gene *CFTR* conforme a classe ou mecanismo molecular pelo qual a síntese, o tráfego ou a função da proteína está sendo afetada. Até o momento, quatro moduladores estão disponíveis para o tratamento de pacientes portadores de variantes específicas causadoras de FC (Lopes-Pacheco 2020).

O primeiro modulador da CFTR disponível (ivacaftor - Kalydeco®) foi aprovado em 2012 para o tratamento de pacientes com FC com idade ≥ 6 anos portadores de pelo menos uma variante G551D (Accurso *et al.* 2010). Este potencializador foi associado a melhorias significativas no nível de cloreto no suor, diferença de potencial nasal e função pulmonar (aumento médio de 8,7 pontos na porcentagem do volume expiratório forçado no primeiro segundo - VEF1 previsto). Em 2015, a combinação de ivacaftor com um corretor (lumacaftor/ivacaftor - Orkambi®) foi então aprovada para pacientes com idade ≥ 12 anos que eram homozigotos p.Phe508del (Wainwright *et al.* 2015). Essa combinação aumentou significativamente a porcentagem do VEF1 previsto (de 2,6 para 4,0 pontos), e foi associada a uma menor taxa de exacerbações pulmonares, hospitalizações e uso de antibióticos intravenosos. Em 2018, uma segunda combinação dupla (tezacaftor/ivacaftor - Symdeko®) foi lançada (Elborn *et al.* 2017) e, muito recentemente, uma terapia de combinação tripla (elexacaftor / tezacaftor / ivacaftor-Trikafta™) foi aprovada para o tratamento de pacientes com idade ≥ 12 anos portadores pelo menos uma variante p.Phe508del (Keating *et al.* 2018).

Esta terapia, muito promissora, resultou em um aumento de até 14 pontos na porcentagem do VEF1 previsto, e em melhorias significativas na concentração de cloreto no suor, exacerbações pulmonares e qualidade de vida.

Por fim, ainda muito incipiente, a terapia gênica vem sendo considerada uma possível promessa de cura (Flotte e Laube 2001; Burney e Davies 2012). No entanto, ainda existe o problema da segurança e eficácia no uso da terapia gênica quanto aos vetores disponíveis (Flotte e Laube 2001), pois inflamação pulmonar está diretamente relacionada a morbidade e mortalidade na FC (Brennan e Geddes 2002).

2 Justificativa

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, multissistêmica, com ampla heterogeneidade genética e clínica (De Boeck 2020). Este distúrbio debilitante é baseado no funcionamento anormal da proteína CFTR e atinge mais de 90.000 pessoas em todo o mundo (Lopes-Pacheco 2020). Abordagens multifatoriais aumentaram a sobrevida de pacientes com FC. Algumas destas medidas são o diagnóstico precoce, o suporte nutricional, a detecção do genótipo, intervenções pulmonares mais eficientes e o monitoramento profissional multidisciplinar.

O desenvolvimento de recentes fármacos moduladores da CFTR (Corriveau *et al.* 2018) tem permitido retificar as alterações causadoras de defeito, conforme o mecanismo molecular pelo qual a síntese, o tráfego ou a função da proteína está sendo afetada (Lopes-Pacheco 2020). Assim, a informação molecular sobre as variantes do paciente maximiza a precisão com que ele é categorizado e tratado ao longo de toda a sua vida (Perlman and Govindaraju 2016; Camerino *et al.* 2019).

O atual protocolo da triagem neonatal para FC, utilizado no país pelo Sistema Único de Saúde (SUS), é realizado em etapas sequenciais. Uma etapa importante consiste nos testes genéticos. No estado do Rio Grande do Sul (RS), em casos em que não foi encontrada a variante mais frequente p.Phe508del em ambos os alelos, é realizado também um painel com 11 variantes mais prevalentes no estado (Rispoli *et al.* 2018). No entanto, considerando que atualmente, mais de 2.000 variantes já foram descritas na literatura, o diagnóstico preciso da FC ainda é um desafio. Mesmo após a triagem neonatal, a caracterização genotípica pode permanecer incompleta para uma parcela de indivíduos. Por isso, a ampliação do diagnóstico é de suma importância. Além disso, no caso de políticas de saúde pública, abrangendo grandes populações, torna-se importante que as metodologias aplicadas sejam custo-

efetivas, ampliando ao máximo o número de variantes pesquisadas, mas mantendo o fator custo reduzido.

Por fim, o entendimento da implicação total das variantes no *CFTR* nos diversos órgãos, ainda é um campo a ser melhor explorado. A compreensão e estudo do perfil da expressão gênica da doença nos diferentes tecidos, auxilia no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas variante e tecido-específicas. Assim, o melhor entendimento das bases genéticas e mecanismos moleculares da doença permitirão um direcionamento mais adequado do tratamento, além de permitir o aconselhamento genético da família e um melhor prognóstico e qualidade de vida do paciente.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma nova abordagem molecular para diagnóstico da Fibrose Cística, e avaliar *in silico* variantes no gene *CFTR*, assim como o perfil da expressão gênica da doença em diferentes tecidos.

3.2 Objetivos específicos

- a. Padronizar a técnica de mini-sequenciamento para detectar múltiplas variantes no gene *CFTR*;
- b. Validar a técnica de mini-sequenciamento com amostras-controle previamente genotipadas e por sequenciamento;
- c. Avaliar *in silico* o efeito da variante S511Lfs*2 na proteína CFTR encontrada em paciente com sinais clínicos típicos de fibrose cística;
- d. Avaliar *in silico* o perfil da expressão gênica em diferentes tecidos de pacientes com FC homocigotos para a variante p.Phe508del.

Os resultados dos estudos relativos aos objetivos específicos a, b e c foram apresentados em formato de artigos científicos publicados e estão apresentados no Capítulo I e II. O conjunto de resultados do objetivo d estão apresentados no Capítulo III sob forma de artigo científico a ser encaminhado à publicação.

Na sessão de anexos da presente tese, encontram-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) referente ao estudo relatado no Capítulo I e os pareceres de aprovação do projeto nos comitês de ética e pesquisa das instituições (Anexo II). O anexo III apresenta um artigo publicado durante o segundo ano da tese, contendo o primeiro protocolo de 11 variantes implementado no SUS/RS, proposto pelo nosso grupo. Além disso, os Anexos IV e V trazem artigos publicados em colaboração referentes a estudos relacionados com a FC e a triagem neonatal. Estes estudos foram realizados adjacientemente aos estudos apresentados nos capítulos I, II e III que compõem a presente tese.

4 Capítulo I

Cystic Fibrosis: A Simple and Customized Strategy for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns

Thaiane Rispoli, Grazielle M. Rodrigues, Simone M. de Castro, Mayara J. Prado, Cláudia M. D. da Silva, Tarciana Grandi, Gilberto B. Fischer, Leonardo A. Pinto, Paulo J. C. Maróstica, Laís C. R. Scortegagna, Helena T. Mocelin, José Eduardo Vargas e Maria L. R. Rossetti

Estado: **Publicado**

Revista: *Molecular Diagnosis & Therapy*

Referência Bibliográfica:

Rispoli T, Rodrigues GM, de Castro SM, *et al* (2020) Cystic Fibrosis: A Simple and Customized Strategy for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns. *Mol Diagnosis Ther* 24:315–325.



Cystic Fibrosis: A Simple and Customized Strategy for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns

Thaiane Rispoli^{1,2} · Grazielle M. Rodrigues^{2,3} · Simone M. de Castro^{3,4} · Mayara J. Prado^{1,2} · Cláudia M. D. da Silva² · Tarciana Grandi² · Gilberto B. Fischer⁵ · Leonardo A. Pinto⁶ · Paulo J. C. Maróstica⁷ · Laís C. R. Scortegagna⁸ · Helena T. Mocelin⁴ · José Eduardo Vargas⁹ · Maria L. R. Rossetti^{1,10}

© Springer Nature Switzerland AG 2020

Abstract

Introduction The incorporation of molecular genetic testing into cystic fibrosis (CF) screening programs increases the specificity of the diagnostic strategy and has the potential to decrease the rate of false-positive results. In this sense, our objective was to develop a genotyping assay that could detect 25 pathogenic variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene with high sensitivity and that could be incorporated into the routine of newborn screening, complementing the current existing protocol used in our public health institution.

Methods A mini-sequencing assay was standardized using single-base extension in a previously genotyped control sample. This strategy was validated in a Brazilian cohort of CF patients by Sanger sequencing.

Results The inclusion of the 25 variants in the current newborn screening program increased the identification rates of two alleles from 33 to 52.43% in CF patients. This new approach was able to detect a total of 37 variants, which represents 93.01% of all mutated alleles described in the last CF Brazilian Register.

Conclusions Mini-sequencing for the simultaneous detection of 25 *CFTR* gene variants improves the screening of Brazilian newborns and decreases the number of inconclusive cases. This method uses minimal hands-on time and is suited for rapid screening, which reduces sample processing costs.

Key Points

A customized panel for the most frequent Brazilian cystic fibrosis (CF) variants increased sensitivity of detection in patients via molecular diagnosis in CF newborn screening.

The panel achieved 93% coverage for CF mutated alleles in the Brazilian population.

This is a low-cost approach for the detection of CF mutated alleles, suitable for developing countries.

José Eduardo Vargas and Maria L. R. Rossetti contributed equally to this work.

✉ Thaiane Rispoli
thaianerispoli@gmail.com

✉ José Eduardo Vargas
josevargas@upf.br

Extended author information available on the last page of the article

1 Introduction

Cystic fibrosis (CF) [OMIM: 219700] is one of the most common life-threatening autosomal recessive diseases described in humans and is caused by variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene [1–3]. Currently, more than 2000 variants have been described in the *CFTR* gene, of which 336 are annotated as pathogenic variants (<http://www.genet.sickkids.on.ca/> and <https://www.cftr2.org/>). CF is characterized by pancreatic insufficiency and chronic obstructive airway disease, which promotes bacterial infection; salty sweat is also detected [4–6], and meconium ileus manifests in 20% of children with CF [7].

Several newborn screening (NBS) approaches are used to identify early CF, improving the treatment of diagnosed patients. All Brazilian NBS protocols include the immunoreactive trypsinogen (IRT) assay in the first 5 days of life as the initial step and the second assessment within 30 days

of newborn life [8–10]; finally, the chloride concentration in sweat, considered the gold standard of CF diagnosis, is performed. Sweat chloride concentrations above 60 mmol/L, as measured by quantitative methods, are used to confirm the diagnosis [10–13]. Genetic analysis is also recommended in NBS to corroborate abnormal sweat test results, focusing on two mutated alleles, which can be identified using different approaches. One of these is next-generation sequencing (NGS) of the *CFTR* gene. However, NGS is not a simple solution, because it generates a large amount of data that requires computational infrastructure and expertise in data interpretation. From a cost perspective, this technology is a practically prohibitive strategy for public health system services, especially in developing countries.

Newborn screening for CF variants was implemented in 2012 in the southernmost state of Brazil, Rio Grande do Sul (RS), by the public health system (Sistema Único de Saúde [SUS]). Only the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant was screened at that time, due to technical limitations and cost. The need for a more accurate test for CF diagnosis led Brazilian institutions to sign an agreement to increase detection of CF and improve diagnosis through a complementary test to be implemented through SUS.

In this context, in a previous work, our group developed a molecular panel based on the 11 most frequent pathogenic variants in the state (c.1624G > T [legacy: G542X], c.1652G > A [legacy: G551D], c.350G > A [legacy: R117H], c.1000C > T [legacy: R334W], c.1657C > T [legacy: R553X], c.3484C > T [legacy: R1162X], c.3846G > A [legacy: W1282X], c.254G > A [legacy: G85E], c.1585-1G > A [legacy: 1717-1G > A], c.2657 + 5G > A [legacy: 2789 + 5G > A], and c.2988 + 1G > A [legacy: 3120 + 1G > A]) [14]. However, the spectrum of pathogenic CF variants continues to expand, and the frequency of the CF-causing variant is different among countries, a consequence of wide ethnic heterogeneity [5, 15]. Panels for molecular screening of CF, when designed and customized for specific populations, can increase sensitivity and specificity levels and have proven to be cost effective and to improve diagnosis through NBS [14].

In this paper, we designed an additional low-cost molecular panel capable of complementing the current molecular protocol for CF diagnosis in southern Brazil used in the public health system, with potential application in all Brazilian states.

2 Materials and Methods

2.1 Samples and Data Collection

Genomic DNA from a cohort composed of 103 individuals with abnormal sweat tests (values above 60 mmol/L) was

extracted from peripheral blood using a salting out protocol [16]. These samples were selected from the Referral Service in Newborn Screening of RS state located in Hospital Materno Infantil Presidente Vargas and from CF reference centers (Hospital São Lucas and Hospital da Criança Santo Antônio/Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre) between June 2016 and June 2018. In addition, whole-*CFTR* sequencing data were collected from medical records, when available, including data from pediatric CF patients of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, from which no blood samples were collected. To validate the genotype concordance and accuracy, 42 control samples were tested. These samples were previously genotyped and kindly provided by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (USA) and the Molecular Genetics Laboratory of the University Institute of Clinical Research (Montpellier, France).

2.2 Mini-sequencing Assay

2.2.1 Variants Selection, Primer Design, and Multiplex PCR

According to the latest CF Brazilian registry [17] and the data obtained from the review of medical records from RS (Table 1), the 25 most frequent variants in CF patients for the RS state and the country of Brazil were selected to compose this new panel: c.3454G > C (legacy: D1152H), c.1645A > C or c.1647T > G (legacy: S549R [rs121908757 and rs121909005]), c.1519_1521delATC (legacy: I507del), c.3140-26A > G (legacy: 3272-26A > G), c.1682C > A (legacy: A561E), c.948delT (legacy: 1078delT), c.613C > T (legacy: P205S), c.1040G > A (legacy: R347H), c.1040G > C (legacy: R347P), c.3196C > T (legacy: R1066C), c.1766 + 1G > A (legacy: 1898 + 1G > A), c.11C > A (legacy: S4X), c.3276C > A or c.3276C > G (legacy: Y1092X), c.579 + 5G > A (legacy: 711 + 5G > A), c.579 + 1G > T (legacy: 711 + 1G > T), c.617T > G (legacy: L206W), c.2991G > C (legacy: L997F), c.1675G > A (legacy: A559T), c.3909C > G (legacy: N1303K), c.3659delC (legacy: 3791delC), c.2052delA (legacy: 2184delA), c.1397C > A or c.1397C > G (legacy: S466X), c.3528delC (legacy: 3659delC), and c.1680-1G > A (legacy: 1812-1G > A). It is important to note that the 11 variants currently applied in screening routine [14] were excluded. However, all patients used to test this new panel were previously analyzed for the 11 variants and c.1521_1523delCTT (legacy: F508del), according to [14].

The Primer3 v.0.4.0 software (Whitehead Institute, Cambridge, UK; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) was used to construct the primers used in the multiplex (Table 2) and mini-sequencing (Table 3) reactions. The IDT Oligo-Analyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA; <https://www.idtdna.com/pages>) and Multiple Primer

Table 1 Patients variants identified in the medical records review in RS state

Variant cDNA (legacy name)	Reference SNP(rs) [#]	Alleles number	Allele frequency (%)	Variant cDNA name (legacy name)	Reference SNP(rs) [#]	Alleles number	Allele frequency (%)
c.1521_1523delCTT (F508del) ^a	113993960	182	49.19	c.3G>A (M1I)	397508657	1	0.27
c.3484C>T (R1162X) ^a	74767530	21	5.68	Exons deletion 20 and 21	Not found	1	0.27
c.1624G>T (G542X) ^a	113993959	20	5.41	c.274G>T (E92X)	121908751	1	0.27
c.3909C>G (N1303K) ^b	80034486	14	3.78	c.1519_1521delATC (I507del) ^b	121908745	1	0.27
c.2988+1G>A (3120+1G>A) ^a	75096551	10	2.70	c.3528delC (3659delC) ^b	121908747	1	0.27
c.254G>A (G85E) ^a	75961395	10	2.70	c.1397C>A or c.1397C>G (S466X) ^b	121908805	1	0.27
c.579+5G>A (711+5G>A) ^b	78440224	6	1.62	Deletion exon 10	Not found	1	0.27
c.579+1G>T (711+1G>T) ^b	77188391	5	1.35	c.1399C>T (L467F)	1800089	1	0.27
c.3196C>T (R1066C) ^b	78194216	5	1.35	c.349C>T (R117C)	77834169	1	0.27
c.2052delA (2184delA) ^b	121908746	4	1.08	c.3454G>C (D1152H) ^b	75541969	1	0.27
c.2657+5G>A (2789+5G>A) ^a	80224560	4	1.08	c.3424_3425insAGTA	397508559	1	0.27
c.3302T>A (M1101K)	36210737	3	0.81	c.2012delT (2143delT)	121908812	1	0.27
c.1680-1G>A (1812-1G>A) ^b	121908794	3	0.81	I506del	Not found	1	0.27
c.3276C>A or c.3276C>G (Y1092X) ^b	121908761	3	0.81	Exon deletion 2	Not found	1	0.27
c.1000C>T (R334W) ^a	121909011	3	0.81	c.1585-1G>A (1717-1G>A) ^a	76713772	1	0.27
c.1652G>A (G551D) ^a	75527207	2	0.54	c.1727G>C (G576A)	1800098	1	0.27
c.1657C>T (R553X) ^a	74597325	2	0.54	c.3846G>A (W1282X) ^a	77010898	1	0.27
c.613C>T (P205S) ^b	121908803	2	0.54	c.3659delC (3791delC) ^b	121908811	1	0.27
c.11C>A (S4X) ^b	397508173	2	0.54	c.3197G>A (R1066H)	121909019	1	0.27
c.38C>T (S13F)	397508395	2	0.54	2185insA	Not found	1	0.27
c.1052C>G (T351S)	1800086	2	0.54	c.601G>A (V201M)	138338446	1	0.27
c.2002C>T (R668C)	1800100	2	0.54	c.617T>G (L206W) ^b	121908752	1	0.27
c.2089C>G (p.Arg697Gly fs*25)	759952845	2	0.54	c.2052dupA (2184insA)	121908786	1	0.27
c.3002_3003delTG (3132delTG)	397508477	2	0.54	c.948delT (1078delT) ^b	121908744	1	0.27
c.3140-26A>G (3272-26A>G) ^b	76151804	2	0.54	CFTRdel2,3	Not found	1	0.27
c.3039delC (3171delC)	121908781	2	0.54	Exons deletion 25_27	Not found	1	0.27
c.3889dupT (4016insT)	121908808	1	0.27	c.1841A>G (D614G)	201124247	1	0.27
c.1682C>A (A561E) ^b	121909047	1	0.27	c.3160C>G (H1054D)	397508510	1	0.27
c.3169 A>G (T1057A)	397508511	1	0.27	c.1040G>A (R347H) ^b	77932196	1	0.27

cDNA complementary DNA, RS Rio Grande do Sul, SNP single-nucleotide polymorphism

[#]Available at <http://cftr2.org> and at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

^aVariants included in current RS state molecular screening in public health system. The c.350G>A (legacy: R117H) variant was not identified in any patient in RS until the time of this analysis

^bVariants included in this study

Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; <https://www.thermofisher.com>) were used to analyze possible hairpin and dimer formations between the sequences of the chosen primers. Sequence alignment was tested using the BLAST online tool (US National Library

of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and CLUSTALW (Wellcome Genome Campus in Hinxton, Cambridge, UK; <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

The multiplex polymerase chain reaction (PCR) was first performed in a final volume of 25 µL containing 10–20 ng

of DNA, 2.5 μL of 1 \times Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 96 nM of each primer (forward and reverse directions) (Table 2), and ultrapure water to make up the final volume. The cycling conditions were initial denaturation at 95 °C for 15 min; 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 1 min and 30 s, and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 15 min. The amplicons obtained were separated in a 3% polyacrylamide gel (0.75-mm thick, 8-cm high) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) at a constant voltage (110 V) for 4 h in 1 \times Tris–borate–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer (1 \times TBE). The gel was stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in 100 mL of 1 \times TBE. PCR products were purified with 2 μL ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) to 5 μL PCR product and incubated for 1 h at 37 °C followed by 20 min at 80 °C to inactivate the enzyme.

2.2.2 Single-Base Extension

Detection of target nucleotides was performed by the mini-sequencing technique using single-base extension (SBE) with the commercial ABI PRISM[®] SNaPshot[™] Multiplex kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). This reaction was carried out using 5 μL of the SNaPshot Multiplex Ready reaction mix (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 3 μL of the purified multiplex PCR product, 0.15 μL of the mixture of extension primers (0.05 μM of each primer) (Table 3), and ultrapure water to make up the final volume to 12 μL . Thermal cycling consisted of an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 96 °C for 10 s, 50 °C for 5 s, and 60 °C for 30 s. Sequentially, the SBE reaction products were treated with 1 U of shrimp alkaline phosphatase (SAP) enzyme (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) at 37 °C for 60 min and 80 °C for 20 min.

2.2.3 Capillary Electrophoresis

Samples were prepared for capillary electrophoresis by adding 9 μL of a mix containing 8.2 μL Formamide Hi-Di (Life technologies, Carlsbad, California, USA) and 0.8 μL of GeneScan 120 LIZ size standard (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) to 1 μL of purified SBE reaction product. The reaction was denatured at 95 °C for 5 min, immediately cooled to 0 °C for 3 min, and then placed in a 3130XL gene analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using POP-4 polymers and 36-cm long capillaries. Data were analyzed using GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as previously described.

2.3 Sanger Sequencing Validation

Sanger sequencing of PCR products was used to validate the variants found by mini-sequencing in the control samples. Validation was performed experimentally by PCR amplification of each primer pair comprising the region where the variant is located, using 10–20 ng of DNA extracted from peripheral blood. The PCR was prepared by addition of 266 nM of each primer (forward and reverse) (Table 2), 2 mM MgCl_2 , 3 μL 1 \times PCR Buffer without Mg, and 2 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) to ultrapure water in a final reaction volume of 30 μL . The cycling conditions were initial denaturation at 95 °C for 5 min; 35 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 45 s, and then a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were purified with ExoSAP-IT Product (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) as described above in Sect. 2.2.1. The sequencing reaction was performed in the forward and reverse directions by using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), according to the manufacturer's instructions, followed by a precipitation protocol with ethanol/EDTA, recommended by the Applied Biosystems chemical guide. The sequencing system used was the ABI 3130xL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Sequences obtained were aligned with the gene region where each variant was located and examined using SeqMan v.7.0.0.0 software (DNASTar, Madison, Wisconsin, USA).

2.4 Statistical Analysis

The Cohen Kappa test was used with IBM SPSS statistical software v.2.1 (Westlands Road, Quarry Bay, Hong Kong) to compare the results obtained with mini-sequencing and Sanger sequencing of control samples. The positive predictive values (PPVs) and negative predictive values (NPVs) with 95% confidence interval (CI) were also analyzed considering an approximate sum of 2000 variants. The threshold for statistical significance was $p < 0.05$.

3 Results and Discussion

A limited number of Brazilian states (São Paulo, Minas Gerais, and Parana e Santa Catarina) perform complementary molecular analysis, and this is usually restricted to the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant [18, 19]. The remaining Brazilian states have limited financial resources to perform molecular tests for CF. The costs associated with detecting a broader spectrum of pathogenic variants continue

Table 2 Primers used for multiplex PCR amplification

Variant cDNA name (legacy name)	Class	Reference SNP(rs)#	Primer name*	Sequence (5'→3' direction)	Amplicon sizes (bp)
c.3276C>A or c.3276C>G (Y1092X)	I	121908761	Y1092X/3272/R1066C_F	AACTCCCAGTGGTAGCCA AG	490
c.3140-26A>G (3272-26A>G)	V	76151804	Y1092X/3272/R1066C_R	TGGAAATGAAGGTAACAG CAA	
c.3196C>T (R1066C)	I	78194216	.		
c.1645A>C or c.1647T>G (S549R)	II	121908757	S549R/A559T_F	TGGAGATGCAATGTTCAA AA	449
		121909005	S549R/A559T_R	GGCACAGATTCTGAGTAA CCA	
c.1675G>A (A559T)	II	75549581	.		
c.579+1G>T (711+1G>T)	I	77188391	711+1G>T/711+5G>A_F	TTAAAGCTGTCAAGCCGT GT	414
c.579+5G>A (711+5G>A)	I	78440224	711+1G>T/711+5G>A_R	CCCAGAACAAGAATTGCT CA	
c.1682C>A (A561E)	II	121909047	A561E/1898+1G>A/1812-1G>A_F	TTTCAGTGAATCGATGTG GTG	374
c.1766+1G>A (1898+1G>A)	I	121908748	A561E/1898+1G>A/1812-1G>A_R	CCCAGTAGGGCAGATCAG ATT	
c.1680-1G>A (1812-1G>A)	I	121908794	.		
c.3909C>G (N1303K)	II	80034486	N1303K_F	TGTTACACAAGGGACTCCA AA	328
			N1303K_R	AGCAGCCTTACCTCATCTGC	
c.1519_1521delATC (I507del)	II	121908745	I507del/S466X_F I507del/S466X_R	TGAATCCTGAGCGTGATTG TGGGTAGTGTGAAGGGTT CAT	302
c.1397C>A or c.1397C>G (S466X)	I	121908805	.		
c.1040G>A (R347H)	IV	77932196	R347H/R347P/1078delT_F	TCCATTCCAAGATCCCTGAT	281
c.1040G>C (R347P)			R347H/R347P/1078delT_R	GTTTGTACAGCCCAGGGA AA	
c.948delT (1078delT)	I	121908744	.		
c.3659delC (3791delC)	I	121908811	3791delC/3659delC_F	TTCAGATGCGATCTGTGAGC	256
c.3528delC (3659delC)		121908747	3791delC/3659delC_R	ACCCTCTGGCCAGGACTTAT	
c.617T>G (L206W)	?	121908752	L206W/P205S_F	TGCTCAGAACCACGAAGT GT	217
c.613C>T (P205S)	?	121908803	L206W/P205S_R	AGGCAGACGCCTGTAACA AC	
c.2991G>C (L997F)	?	1800111	L997F_F	GACACACTTTGTCCACTT TGC	199
			L997F_R	GAGTTGCTGTGAGGTTTG GA	
c.3454G>C (D1152H)	IV	75541969	D1152H_F	ATTGCAGTGGGCTGTAAA CT	189
			D1152H_R	CAGATACACAGTGACCCT CAA	
c.2052delA (2184delA)	I	121908746	2184delA_F 2184delA_R	GGAGATGCTCCTGTCTCCTG TCTTCGATGCCATTCAATTG	161
c.11C>A (S4X)	I	397508173	S4X_F	CAGGTCAGAGAAAAAGGG TTG	146
			S4X_R	GAGACAACGCTGGCCTTT	

bp base pairs, cDNA complementary DNA, PCR polymerase chain reaction, SNP single-nucleotide polymorphism, ? not yet classified

*Primer sets used in PCR multiplex and sequence analysis

Table 3 Primers used for *CFTR* mini-sequencing assay

Variant cDNA name (legacy name)	Sequence (5' → 3' direction)	Orientation	Primer length (bp)	Allele (wt/v)	Peak size-range set in GeneMapper
c.3528delC (3659delC)	CAACAGAAGGTAAACCTAC	Forward	19	C/A	21.74–24.78
c.1647T > G (S549R)	GGAGGTCAACGAGCAAGAATTTC	Reverse	23	A/C,G	27.00–29.25
c.1397C > A or c.1397C > G (S466X)	ATAATGATGGGTTTTATTCCAGACTT	Forward	27	C/A,G,T	29.99–33.38
c.2052delA (2184delA)	ATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAA CAAAAAA	Forward	31	A/C	33.13–35.45
c.3659delC (3791delC)	CCAAATGACTGTCAAAGATCTCAC AGCAAATACA	Forward	35	C/A	35.38–37.73
c.3909C > G (N1303K)	CCATATTTCTTGATCACTCCACTG TTCATAGGGATCCAA	Forward	39	G/C	40.24–42.82
c.1675G > A (A559T)	TACAGCAAATGCTTGCTAGACCAA TAATTAGTTATTCACCTTG	Reverse	43	C/T	45.08–47.29
c.2991G > C (L997F)	ATGTGAAAATGTTTACTCACCAAC ATGTTTCTTTGATCTTACAGTT	Forward	47	G/C	48.00–50.37
c.617T > G (L206W)	GCAGACGCCTGTAACAACCTCCAG ATTAGCCCCATGAGGAGTGCCACT TGC	Reverse	51	A/C	51.79–53.90
c.579 + 1G > T (711 + 1G > T)	AAGTATTGGACAACCTTGTTAGTCT CCTTTCCAACAACCTGAACAAATT TGATGAA	Forward	55	G/T	55.34–58.43
c.579 + 5G > A (711 + 5G > A)	CCGCCTTCCAGTTGTATAATTTA TAACAATAGTGCCTAAAAGATTA ATCAATAGGTA	Reverse	59	C/T	60.01–62.36
c.3276C > A or c.3276C > G (Y1092X)	GCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCA CAAAGCTCTGAATTTACATACTGC CAACTGGTCTTTGTA	Forward	63	C/A,G	63.85–66.16
c.11C > A (S4X)	GGCATTAGGAGCTTGAGCCCAGAC GGCCCTAGCAGGGACCCAGC GCCCGAGAGACCATGCAGAGGT	Forward	67	C/A,T	68.15–70.32
c.1682C > A (A561E)	CTTTTTCTGTAAAAACATCTAGGT ATCCAAAAGGAGAGTCTAATAAAT ACAAATCAGCATCTTTGTATACT	Reverse	71	G/T	69.74–72.30
c.3196C > T (R1066C)	CTATGGAAATATTTTACAGGCAGG AGTCCAATTTTCACTCATCTTGT ACAAGCTTAAAAGGACTATGG ACACTT	Forward	75	C/A,T	74.43–77.81
c.1040G > A (R347H)/c.1040G > C (R347P)	TCTGTGCTTCCCTATGCACTAATC AAAGGAATCATCCTCCGAAAATA TTCACCACCATCTCATTCTGCATT GTTCTGC	Forward	79	G/A,C	78.88–81.95
c.613C > T (P205S)	GGGGTGGAAGATACAATGACACCT GTTTTTGCTGTGCTTTTATTTTCC AGGGACTTGCATTGGCACATTTCCG TGTGGATCGCT	Forward	83	C/T	85.42–88.14
c.948delT (1078delT)	TTTTATAGAACAGAAGTAACT GACTCGGAAGGCAGCCTATGT GAGATACTTCAATAGCTCAGCCTT CTTCTTCTCAGGGTTCTT	Forward	87	T/G	87.68–90.08
c.1645A > C (S549R)	TGACTCTCTAATTTTCTATTTTTG GTAATAGGACATCTCCAAGTTTGC AGAGAAAGACAATATAGTTCTTGG AGAAGGTGGAATCACACTG	Forward	91	A/C	92.09–93.86

Table 3 (continued)

Variant cDNA name (legacy name)	Sequence (5' → 3' direction)	Orientation	Primer length (bp)	Allele (wt/v)	Peak size-range set in GeneMapper
c.3140-26A>G (3272-26A>G)	TTTAACCAATGACATTTGTGATAT GATTATTCTAATTTAGTCTTTTTTC AGGTACAAGATATTATGAAATTAC ATTTTGTGTTTATGTTATTTTGCA	Forward	95	A/G	95.44–97.43
c.1519_1521delATC (I507del)	GAAGTGGAGCCTTCAGAGGGTAAA ATTAAGCACAGTGGAGAATTTCA TTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATT ATGCCTGGCACCATTAAGAAAAT ATC	Forward	99	A/T	99.56–101.81
c.1680-1G>A (1812-1G>A)	GACCATATTGTAATGCATGTAGTG AACTGTTTAAGGCAAATCATCTAC ACTAGATGACCAGGAAATAGA GAGGAAATGTAATTTAATTTCCAT TTTCTTTTTA	Forward	103	G/A	103.04–105.41
c.1766+1G>A (1898+1G>A)	CAATGGTGAACATATTTCTCAAGA GGTAAAATGCAATCTATGATGGGA CAGTCTGTCTTTCTTTTATTTTAG CATGAGCATTATAAGTAAGGTATT CAAAGAACATA	Reverse	107	C/T,G,A	106.30–108.78
c.3454G>C (D1152H)	TCAATATACGGTATATAGTTCTTC CTCATGCTATTACTCATACTTTGT TACTTGTCTGAATTTTTTTCATAA AAGTTAAAAGATGATAAGACTTA CCAAGCTATCCACAT	Reverse	111	C/G	109.46–111.68

bp base pairs, *cDNA* complementary DNA, *CFTR* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *wt* wild type, *v* variant

to be a barrier for CF diagnosis in Brazil. The current algorithm in RS state for CF screening of newborns provided by the public health system detects the most frequent pathogenic variant c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) and 11 variants on a molecular panel previously employed by our group [14]. In this new approach, we selected 25 additional variants frequently identified in CF patients from Brazil [17] with a high potential for inclusion in the Brazilian public health system (Table 3). Mini-sequencing validation was performed on 42 previously genotyped control samples and was highly accurate ($\kappa = 1.00$; $p < 0.001$), without any non-specific peaks or ambiguous results. The strategy can identify 25 variants in the same reaction and in the same capillary electrophoresis, with high discrimination power. A representative electropherogram of a control DNA sample is shown in Fig. 1a. Similarly, electropherograms of samples with wild-type and mutated alleles and the Sanger sequencing validation are given in Fig. 1b–d, respectively. However, all electropherograms are available on request from the corresponding author.

To reflect the real impact of our approach on diagnosis, we performed a comparative analysis to define coverage thresholds for detection of CF-related variants. In this analysis we compared the two approaches used in routine NBS (classical c.1521_1523delCTT [legacy: F508del] variant

and the 11-variant panel [14]) with the complementary 25 variants included in this new panel. A cohort composed of 103 patients with CF was used for sequential validation of these screening tests (Fig. 2a). All these patients were positive to sweat test; of these, the proportion of newborns that were IRT positive is 75.5% (34/45). From the cohort, 14.6% were identified as homozygous for the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant and 37.9% as heterozygous with only one allele detected, while 47.5% corresponded to different variants. In the next step, based on the previous results, we used the current panel available from diagnostic services, which can detect 11 variants, aiming to identify unknown alleles. This molecular screening registered 33% of individuals with both mutated alleles identified for one variant, 29.1% heterozygous individuals, and the remaining 37.9% with no alleles identified. Finally, we tested the complementary 25 variants suggested to be included in the previous molecular protocol used in the Brazilian medical institutions from the public health service. Of our tested cohort, 52.43% had variants in both alleles identified, 18.5% were heterozygous, and the remaining 29.1% had unknown variants.

In previous work, the NGS technique has been performed to identify variants throughout the whole *CFTR* gene [20, 21]. In another project from the Brazilian CF Study Group (<http://portalgbefc.org.br/>), use of patients from the analyzed

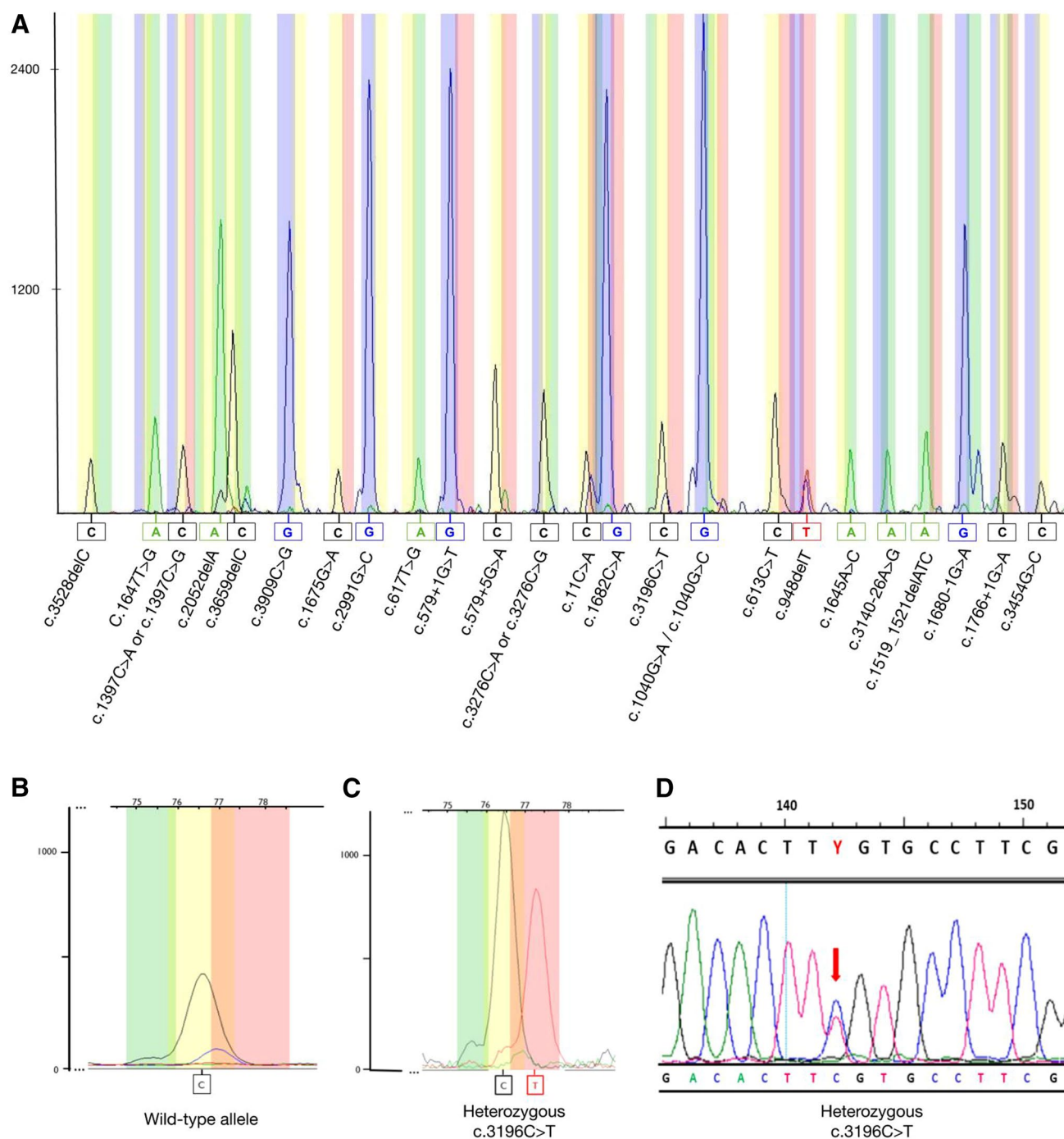


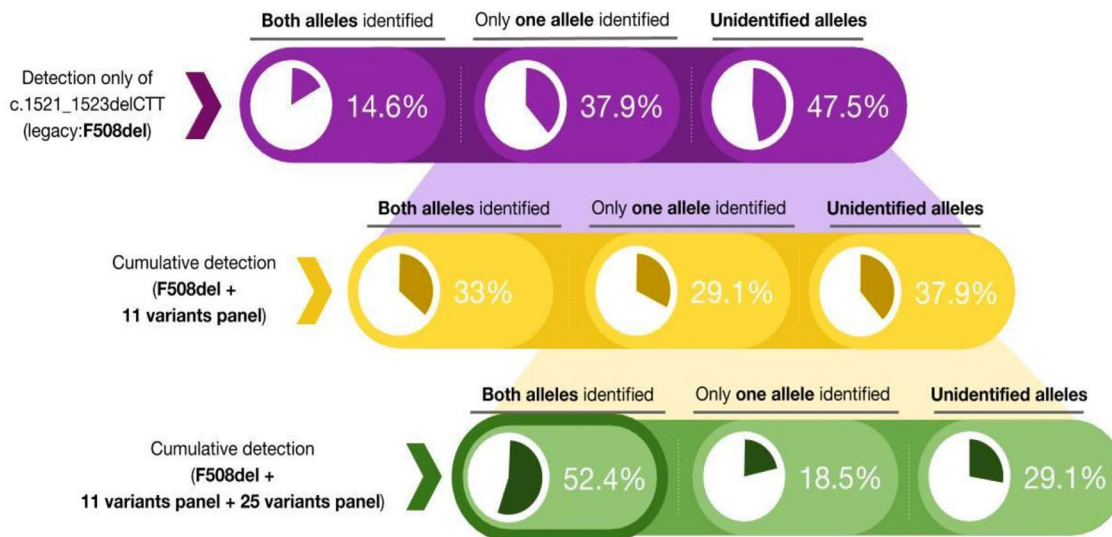
Fig. 1 Electropherogram of a mini-sequencing assay. **a** Electropherograms of SNaPshot for detection of 25 *CFTR* variants in one sample along with standard size GeneScan 120 LIZ. **b** Electropherograms of SNaPshot shows the wild-type allele C (dark peak), and the example **c** shows mutated allele T (red peak) for c.3196C>T (legacy:

R1066C) variants. **d** DNA sequencing of the example **c**: heterozygosity pattern (red arrow), C allele (blue peak), and T allele (red peak). The first sequence is the standard sequence. Y: C or T. *CFTR* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

cohort is ongoing. In this aforementioned work, a high-throughput approach to the *CFTR* gene was performed by Mendelics® (<http://www.mendelics.com/>), and the genotyping results from this *CFTR* sequencing were available for

our analysis. These subjects were included in our cohort. In this research, 60% of all mutated alleles were identified, and 10.77% showed only one variant. Considering a total of 37 variants screened, it was possible to identify both alleles

A



B

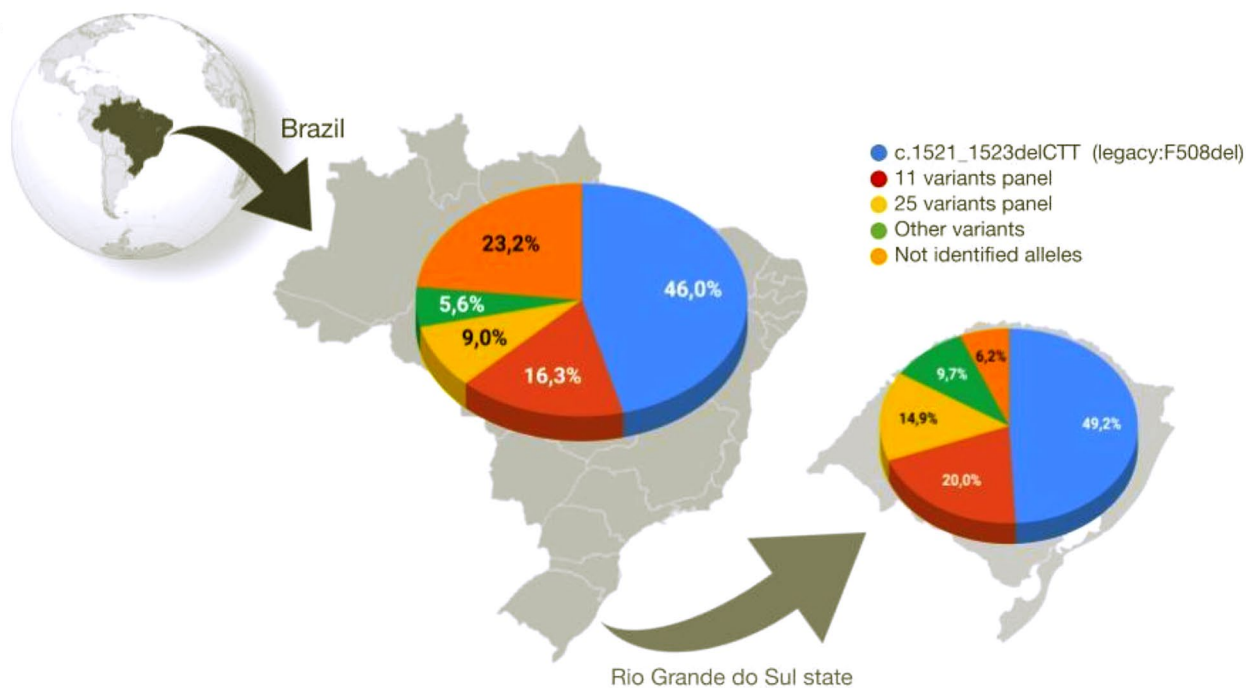


Fig. 2 Comparative analysis of CF-related variant detection and overview of the detectable allelic frequencies present in each approach in RS state and Brazil. **a** CF diagnosis is confirmed when two pathogenic variants are identified. In a cohort of 103 individuals, both alleles were identified in 14.6% when only the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant was researched (in purple). Patients with only one identified allele or two unidentified alleles proceeded to the 11-variant research panel, in addition to c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) (in yellow). The identification rate of both alleles increased to 33%. Finally, for the remaining patients with no identified alleles, the 25-variant panel was performed. The circled green box shows the increase in the detection rate (52%) of two identified alleles. We suggest that employing the 11-variant panel with this new panel plus

c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) (totaling 37 variants) will increase the number of variants detected. **b** Summary of Brazilian *CFTR* variants recorded in the Brazilian Registry of Cystic Fibrosis 2016 database, as reported on November 2018 (Brazil) and by medical record review of patients in follow-up in CF reference centers of RS state. The frequencies of mutated alleles were grouped according to the panel in which they are included. This molecular screen of 37 proposed variants comprises 90% and 93% of alleles, with variants identified in the state RS and Brazil, respectively, demonstrating high coverage in the entire country. This percentage was calculated only with the identified alleles (blue, red, yellow, and green slices). *CF* cystic fibrosis, *CFTR* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *RS* Rio Grande do Sul

in 52.43% of samples, a very similar percentage to the NGS result, using an inexpensive methodology and simpler data analysis. In addition, based on sample analysis, the PPV and the NPV were 100% (95% CI 88.3–100) and 99.1% (95% CI 98.7–99.5), respectively.

Another point to consider is the panel design, which is based on the demand to complement the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) and current molecular protocol, which contains 11 pathogenic variants [14]. For RS, 311 alleles were identified (90%) by the current molecular screening [14], relative to a total number of 347 alleles (Table 1 and Fig. 2b). Similarly, our approach can detect 93% of all known mutated alleles in Brazil (Fig. 2b). This percentage is obtained from the division of 4424 alleles described from the Brazilian registry of CF (<http://www.gbefc.org.br>) by the total 4756 of all Brazilian mutated alleles (Fig. 2b). It is important to note that all Brazilian mutated alleles were previously analyzed from NGS and commercial diagnostic kits. In this sense, the updated protocol that combines the detection of c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) plus 11 variants and 25 new variants can be applied to diagnose mutated alleles with cost–benefit, both regionally and at the national level. Considering the total number of variants, the molecular research for 37 variants in RS has a PPV of 100% (95% CI 90.2–100) and an NPV of 98.5% (95% CI 97.9–99.0). In Brazil, this panel has a PPV of 100% (95% CI 92.2–100) and an NPV of 93.7% (95% CI 92.6–94.7), demonstrating good predictive power of genotyping in both analyses, in addition to good coverage of alleles with identified variants.

We suggest that the mini-sequencing technique for the 37-variant targeted panel can be an alternative method for inclusion in the neonatal screening routines, after IRT assay and sweat test, in emerging countries with limited resources. The technique also delivers high-throughput molecular screening with lower cost, allowing the simultaneous analysis of several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in a short period [22]. Another great advantage of mini-sequencing is the ability to customize the target SNP group, and it is possible to adapt panels according to the frequency of variants in each country, and even in each state. This is a very important factor considering populations with great ethnic heterogeneity such as Brazil, where allelic frequencies may vary between regions of the country [17]. In addition, the high allele frequency of the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant (45.97% observed in Brazil [17] and 49.19% observed in RS; Table 1) and lower reagent costs show that molecular testing on this variant must be the first conducted, followed by molecular analysis of other variants (11-variant panel plus 25-variant panel) combined in a 36-variant analysis. These characteristics would help to incorporate the molecular strategy proposed in this work into existing Brazilian public health.

Despite all the advantages that this technique has, it fails to identify large deletions, other types of variants such as insertions, and some overlapping variants. Another limitation is that it is not possible to include all the known variants described within the same mini-sequencing panel.

Although this molecular strategy performs in a specific population, like that of Brazil, it can be adapted to any other population.

Currently, several Food and Drug Administration (FDA)-approved testing platforms are commercially available for molecular testing of the *CFTR* gene. According to the American College of Medical Genetics, a molecular panel must include a minimum of 23 variants. In addition, any testing platform should rely heavily on the testing equipment available and on the ethnic makeup of the patient population that will be screened. In our work, the proposed molecular panel meets these international requirements and is adapted to the economic reality of Brazil; for these reasons, its applicability is real.

4 Conclusion

In this work we employed a panel specially customized for the detection of the most frequent Brazilian CF variants. The inclusion of 25 complementary variants in molecular diagnostics for CF NBS increased the sensitivity of detection in patients with undefined alleles, allowing a wider scope of molecular diagnosis. In this sense, 93.01% of the mutated alleles for CF in the Brazilian population are covered using this new approach. In addition, this test can facilitate the implementation of molecular screening in developing countries, where the availability of financial resource is limited.

Compliance with Ethical Standards

Funding The study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (1260-2551/13-0).

Ethics approval This study was approved by the ethics committee of the Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Hospital da Criança Santo Antônio, Hospital São Lucas da PUCRS, and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Patient consent Obtained.

Conflict of interest The authors, Thaiane Rispoli, Grazielle M. Rodrigues, Simone M. de Castro, Mayara J. Prado, Cláudia M.D. da Silva, Tarciana Grandi, Gilberto B. Fischer, Leonardo A. Pinto, Paulo J.C.

Maróstica, Laís C.R. Scortegagna, Helena T. Mocelin, José E. Vargas, and Maria L.R. Rossetti, have no conflict of interest to declare.

References

- O'neal WK, Knowles MR. Cystic fibrosis disease modifiers: complex genetics defines the phenotypic diversity in a monogenic disease. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 2018;19:201–22.
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, et al. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell.* 1990;62:1227–33.
- Collins FS, Drumm ML, Cole JL, et al. Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science.* 1987;235:1046–9.
- Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(1):129–40 (**Epub ahead of print**).
- De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46:e97–108.
- Sosnay PR, White TB, Farrell PM, et al. Diagnosis of cystic fibrosis in nonscreened populations. *J Pediatr.* 2017;181S:S52–S57.e2.
- Sathe M, Houwen R. Meconium ileus in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2017;16(Suppl 2):S32–9.
- Castellani C, Massie J, Sontag M, et al. Newborn screening for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.* 2016;4:653–61.
- Rodrigues R, Magalhaes PKR, Fernandes MIM, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study. 2009. www.bjournal.com.br. Accessed 2 June 2019.
- Athanazio RA, da Silva Filho LVRF, Vergara AA, et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2017;43:219–45.
- Servidoni MF, Gomez CCS, Marson FAL, et al. Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol.* 2017;43:121–8.
- Taylor CJ, Hardcastle J, Southern KW. Physiological measurements confirming the diagnosis of cystic fibrosis: the sweat test and measurements of transepithelial potential difference. *Paediatr Respir Rev.* 2009;10:220–6.
- Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008;153:S4–14.
- Rispoli T, Martins de Castro S, Grandi T, et al. A low-cost and simple genetic screening for cystic fibrosis provided by the Brazilian public health system. *J Pediatr.* 2018;199:272–7.
- Faucz FR, Souza DAS, Olandoski M, et al. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet.* 2010;55:71–6.
- Mousquer GT, Maciel LP, Pompeu Saraiva AC, et al. Validation of a quick and low-cost DNA extraction protocol applicable to long-stored blood samples. *Anal Biochem.* 2018;561–562:47–51.
- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística, The Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry, 2016. <http://www.gbefc.org.br>. Accessed 2 June 2019.
- Rodrigues R, Magalhaes PKR, Fernandes CS, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study. *Braz J Medical Res.* 2009;42(10):973–8.
- Sih T, Godinho R, Franco LP, et al. Cystic fibrosis: Brazilian ENT experience. *Int J Otolaryngol.* 2012;2012:204696.
- Nunes LM, Ribeiro R, Niewiadonski VDT, et al. A new insight into CFTR allele frequency in Brazil through next generation sequencing. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52:1300–5.
- Salinas DB, Sosnay PR, Azen C, et al. Benign and deleterious cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations identified by sequencing in positive cystic fibrosis newborn screen children from California. *PLoS One.* 2016;11:e0155624.
- Latini FRM, Gazito D, Arnoni CP, et al. A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. *Blood Transfus.* 2014;12(Suppl 1):S256–63.

Affiliations

Thaiane Rispoli^{1,2} · Grazielle M. Rodrigues^{2,3} · Simone M. de Castro^{3,4} · Mayara J. Prado^{1,2} · Cláudia M. D. da Silva² · Tarciana Grandi² · Gilberto B. Fischer⁵ · Leonardo A. Pinto⁶ · Paulo J. C. Maróstica⁷ · Laís C. R. Scortegagna⁸ · Helena T. Mocelin⁴ · José Eduardo Vargas⁹ · Maria L. R. Rossetti^{1,10}

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

² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES-RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Serviço de Referência em Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁶ Hospital São Lucas da PUCRS, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁸ Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

¹⁰ Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular Aplicada a Saúde, Canoas, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

5 Capítulo II

Novel frameshift variant of the *CFTR* gene: S511Lfs*2 from phenotype to molecular predictions

Thaiane Rispoli, Grazielle Motta Rodrigues, Mayara Jorgens Prado, Leonardo Araújo Pinto,
Marcelo Tadday Rodrigues, Cynthia Rocha Dullius, Tarciana Grandi, Cláudia Maria Dornelles da
Silva, José Eduardo Vargas, Maurício Menegatti Rigo e Maria Lucia Rossetti

Estado: **Publicado**

Revista: *Molecular Biology Reports*



Novel frameshift variant of the *CFTR* gene: S511Lfs*2 from phenotype to molecular predictions

Thaiane Rispoli^{1,2} · Grazielle Motta Rodrigues^{2,3} · Mayara Jorgens Prado^{1,2} · Leonardo Araújo Pinto⁴ · Marcelo Tadday Rodrigues⁵ · Cynthia Rocha Dullius⁵ · Tarciana Grandi² · Cláudia Maria Dornelles da Silva² · José Eduardo Vargas⁶ · Maurício Menegatti Rigo⁷ · Maria Lucia Rossetti^{1,8}

Received: 27 March 2020 / Revised: 9 July 2020 / Accepted: 19 July 2020 / Published online: 31 July 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease caused by variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. There are over 2,000 different pathogenic and non-pathogenic variants described in association with a broad clinical heterogeneity. In this work, we identified a novel variant S511Lfs*2 in *CFTR* gene that has not been reported in patients with CF. The patient was a female genotyped with c.1000C>T (legacy name: R334W) variant (pathogenic, CF-causing) and the novel variant (S511Lfs*2). We verified the amino acid sequence, the protein structure, and predicted the pathogenicity employing computational analysis. Our findings showed that S511Lfs*2 is a frameshift variant and suggest that it is associated with severe CF phenotype, as it leads to a lack of CFTR protein synthesis, and consequently the loss of its functional activity.

Keywords Cystic fibrosis · S511Lfs*2 variant · *CFTR* gene · CFTR protein · Frameshift variant

Introduction

Cystic fibrosis (CF-OMIM 219700) is an autosomal recessive inherited disorder caused by variants in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) gene [1]. The *CFTR* gene encodes a protein of 1480 residues in length (UniProt ID: P13569). This protein belongs to the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily and its function is related to the transport of chloride ions across

cell membranes [2, 3], regulation of airway fluid homeostasis [4–6], and defense against pathogens by the regulation of pH and ion content in the airway surface fluid layer [4, 6, 7].

The three-dimensional structure of CFTR protein is composed by five domains. Two transmembrane domains (TMDs), responsible for the chloride ion translocation pathway, two cytoplasmic Nucleotide Binding Domains (NBDs) with ATPase activity that controls channel gating, and a regulatory (R) domain that mediates CFTR activity upon phosphorylation [8]. More than 2000 variants have been already described in the *CFTR* gene (CFTR1, available in <http://>

Thaiane Rispoli and Grazielle Motta Rodrigues have contributed equally to the work.

✉ Thaiane Rispoli
thaianerispoli@gmail.com

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

² Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Hospital São Lucas da PUCRS, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Serviço de Fibrose Cística - Adultos, Serviço de Pneumologia, Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁶ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷ Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁸ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

www.genet.sickkids.on.ca/), and around 300 variants are considered pathogenic (CFTR2, available in <https://www.cftr2.org/>). These pathogenic variants are classified into major seven classes (IA, IB, II, III, IV, V, and VI), according to the molecular mechanisms' disruption: synthesis, traffic, or function of the protein [9, 10]. The classes IA, IB, II, and III are associated with a more severe prognosis due to defective protein production, processing, and regulation; the classes IV, V and VI are associated with milder prognosis, because CFTR protein maintains residual activity [9]. However, a mutation expanded classification can be considered with a combination of classes once a single mutation can cause defects in the CFTR protein by multiple mechanisms [11]. Therefore, the study of variants is fundamental to understand the patient prognostic and also to develop new treatments based on gene variants [12].

In this study, we described a novel frameshift variant (S511Lfs*2) resulted from the deletion of two thymines. The frameshift yielded a codon that specifies the amino acid leucine followed by a premature termination codon (PTC). We have combined the patient's clinical features and structural bioinformatics data to propose the variant's effects in the CF phenotype.

Case report

Patient data collection

The subject from a CF Reference Center (Hospital São Lucas da PUCRS) was a 23-year-old female with a confirmed CF diagnosis at the age of twelve. She had the first sweat test intermediate (57 mmol/L) and the second abnormal (97 mmol/L). The patient had a history of respiratory infections with the airway colonized by *Staphylococcus aureus*, severe bronchiectasis—diagnosed by chest computed tomography (CT)—and mucoid impaction of the large airways. This subject also showed a mild airflow limitation with FVC = 2.75 (87% predicted), FEV1 = 2.12 (75% predicted) and a reduced FEV1/FVC ratio = 0.77 (86% predicted), recurrent pancreatitis, pancreatic insufficiency, and critical failure to thrive (weight Z-score of -0.88 and height Z-score of -2.04).

Molecular genetic analysis of the CFTR gene

Genomic DNA extraction from peripheral blood was performed by salting out assay [13]. The DNA was submitted to a molecular screening that analyses the presence of the eleven variants usually found in CF patients from south of Brazil and the main frequency variant c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) found in CF patients worldwide. The

eleven variants panel was carried out by SNaPshot [14] and the c.1521_1523delCTT was analysed by Sanger sequencing method as following. A PCR reaction was performed to amplify the exon 11 of the CFTR gene using specific primers (5'-TGAATCCTGAGCGTGATTTG-3' and 5'-TGGGTAGTGTGAAGGGTTCAT-3'). The PCR product was purified with ExoSAP-IT PCR (Affymetrix, USA) according to the manufacture's protocol and used in the Sanger sequencing that was carried out with BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, USA). Then the product was precipitated by ethanol/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) protocol recommended by Applied Biosystems chemistry guide [15]. The sequencing system used was the Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems, USA). Sequences obtained were aligned with the CFTR gene sequence (e.g. RefSeq NG_016465.4) and examined using SeqMan software v.17 (DNASTar, USA).

Cloning of the novel variant

To precisely characterize the deletion, an allele-specific cloning and sequencing method was carried out. The exon 11 of the CFTR gene was amplified by PCR using specific primers that contains a target sequence at the 3'-end of the primer, a sequence for restriction enzyme (BamHI in the forward primer and EcoRI in the reverse) and 6pb at the 5'-end of the primer to ensure efficient DNA cleavage by the restriction enzymes (CFTR_BamHI_F 5'-tttttGGATCCTGAATCCTGAGCGTGATTTG-3' and CFTR_EcoRI_R 5'-tttttGAATTGATGCTTTGATGACGCTTCTG-3'). The PCR product was precipitated using the sodium acetate/ethanol method [16]. Each 1 µg of DNA from PCR product purified and pUC18 vector were sequentially digested with EcoRI and BamHI (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. After that, the DNA reactions were precipitated with sodium acetate/ethanol method. Using a 1:3 molar ratio of vector:insert DNA (100 ng of cut plasmid and 26 ng of cut insert) and 3 units of T4 DNA Ligase (Promega) the ligation reaction was performed according to manufacturer's recommendations and incubated for 18 h at 22 °C. The DNA was precipitated with sodium acetate/ethanol method and then transformed into XL1-Blue competent cells that were plated on 25 mL of LB solid medium with 0.85 mg X-Gal, 1 mM IPTG and 2.5 mg ampicillin. The plate was incubated overnight at 37 °C. White colonies resulted from transformation were used as a template to perform a PCR with the M13 primers to confirm the correct ligation. The Sanger sequencing with M13 primers was performed as described above in the "Molecular genetic analysis of the CFTR gene" section.

Structure and pathogenicity prediction

The ExPASy software was used to obtain the translation of the nucleotide sequence to a protein sequence [17]. The putative protein structure was built using UCSF chimera software based on the structure found in Protein Data Bank (PDB ID: 5UAK) [18]. The MutationTaster software was used to predict the pathogenicity considering evolutionary conservation, mRNA, and protein structure/function through phyloP/phastCons scores [19]. The PhyloP measure the conservation or acceleration, either lineage-specific or across all branches and PhastCons the conservation scoring and identification of conserved elements [19].

Results

The SNaPshot genetic analysis identified a compound heterozygote. One variant was c.1000C>T (legacy: R334W), which has been previously reported in the CFTR2 database (Fig. 1). The other variant was a novel deletion variant found by Sanger sequencing; however, it was challenging to identify the deletion correctly (Fig. 2a). Thereby, to characterize this novel variant, we isolated the sequences by allele-specific cloning (Fig. 2b).

The novel variant, S511Lfs*2 was discovered in exon 11 of the *CFTR* gene, where two thymines at position g.98818_98819del (NG_016465.4) were deleted (Fig. 2b). As a result, this deletion formed the premature termination codon UGA after replacing serine for leucine being a frameshift variant type (Fig. 2c). The novel variant was deposited in Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1) as well as in the public archive of human variations and phenotypes (ClinVar; SCV000987313) and in the public archive of Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP; rs1562898471).

In silico analysis in MutationTaster software suggests that this deletion can modify functions of key regions such as the ATP-binding domain and the PDZ-binding domain (Fig. 3). The value obtained of two conservation parameters used, PhyloP (1.528–4.75 value) and PhastCons (1 value), revealed that deleted thymines are in a conserved region in the *CFTR* gene corroborating with pathogenic features. Furthermore, this PTC promotes a loss of approximately 65% of full-length CFTR protein (Fig. 2c), possibly resulting in nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The structure of the protein lacking amino acids after the termination codon is shown in Fig. 3.

Discussion

This is the first study worldwide to describe the S511Lfs*2 variant identified in a Brazilian CF patient. Variants identification is essential for diagnosis purposes, specific treatment

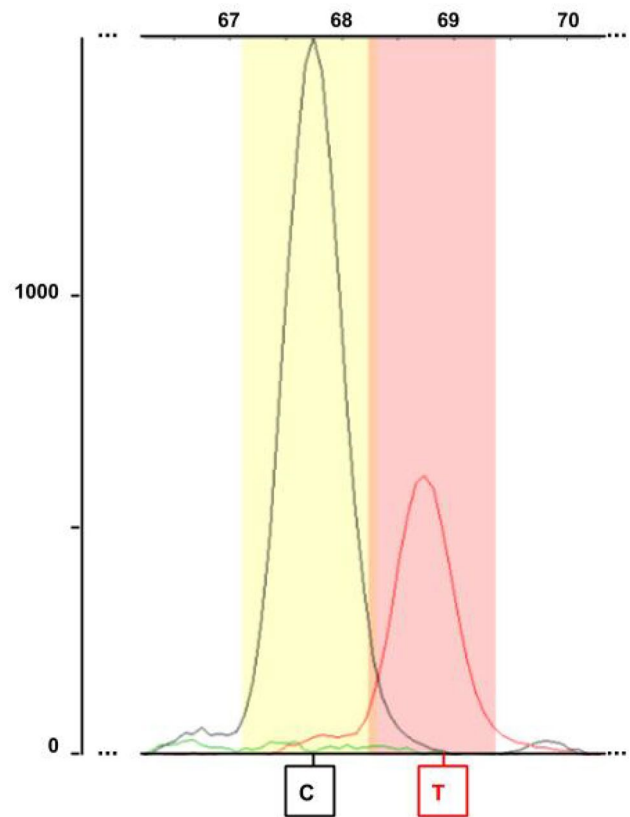


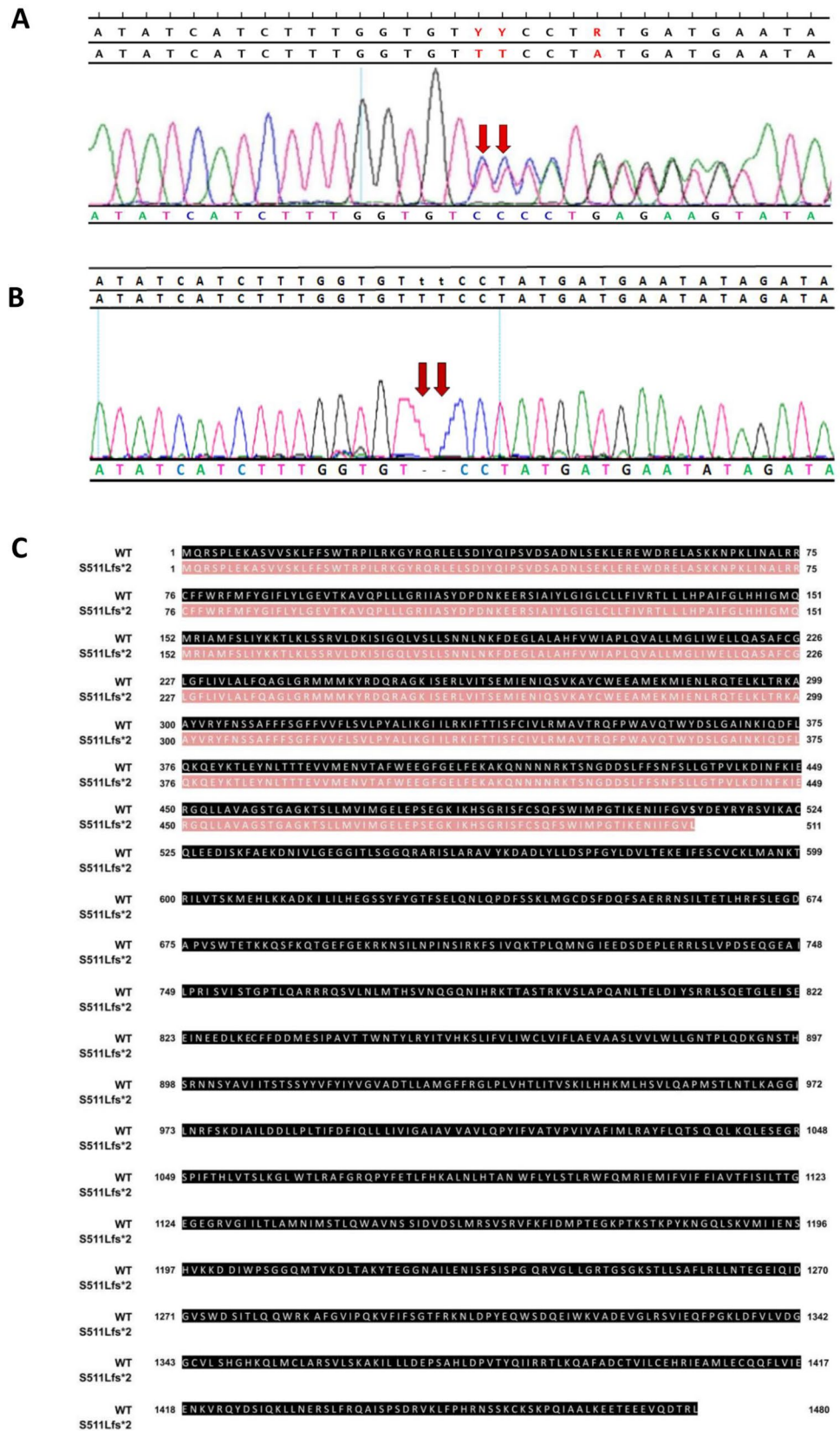
Fig. 1 Detection of c.1000C>T (legacy name: R334W) variant in heterozygosity in *CFTR* gene. Electropherogram of SNaPshot methodology: C allele (wild-type; black peak) and T allele (variant; red peak)

approaches, and genetic counseling [21]. We also demonstrate an in silico model to elucidate the protein alteration at a structural level.

The S511Lfs*2 variant leads to a change in the amino acids sequence (S511L) and promotes the appearance of a PTC. The PTC leads to the production of truncated and non-functional CFTR protein. It is possible that this modification may activate a post-transcriptional mechanism called nonsense-mediated mRNA decay (NMD) which detects and degrades the mutated transcript [22–24]. However, more studies would be required to evidence this mechanism. Thus, it is reasonable to classify this variant as a class IB due to the possible NMD activation, associated with pathogenicity prediction values, clinical data from the patient, and defective protein production. [9, 10]. It is important to emphasize that independently of the NMD activation, the protein structure would be strongly affected due to the absence of full-length functional CFTR protein (Figs. 2c and 3). Consequently, protein functionality would be lost.

Structural analysis of CFTR protein shows that the novel variant S511Lfs*2 is in the NBD1 domain, near the c.1521_1523delCTT (legacy: F508del) variant. The in

Fig. 2 From nucleotide sequence to the amino acid sequence of S511Lfs*2 protein. **a** Sequence electropherogram of the exon 11 (*CFTR* gene) showing the novel variant S511Lfs*2 in heterozygous state. **b** Detection of the novel S511Lfs*2 (deletion of two thymines) variant in one of the alleles after allele-specific cloning. The two red arrows confirm the deletion of two thymines in one allele. **c** CFTR protein amino acid sequence obtained from ExPASy software. The wild-type (black) and the mutated (pink) CFTR amino acid sequence are represented



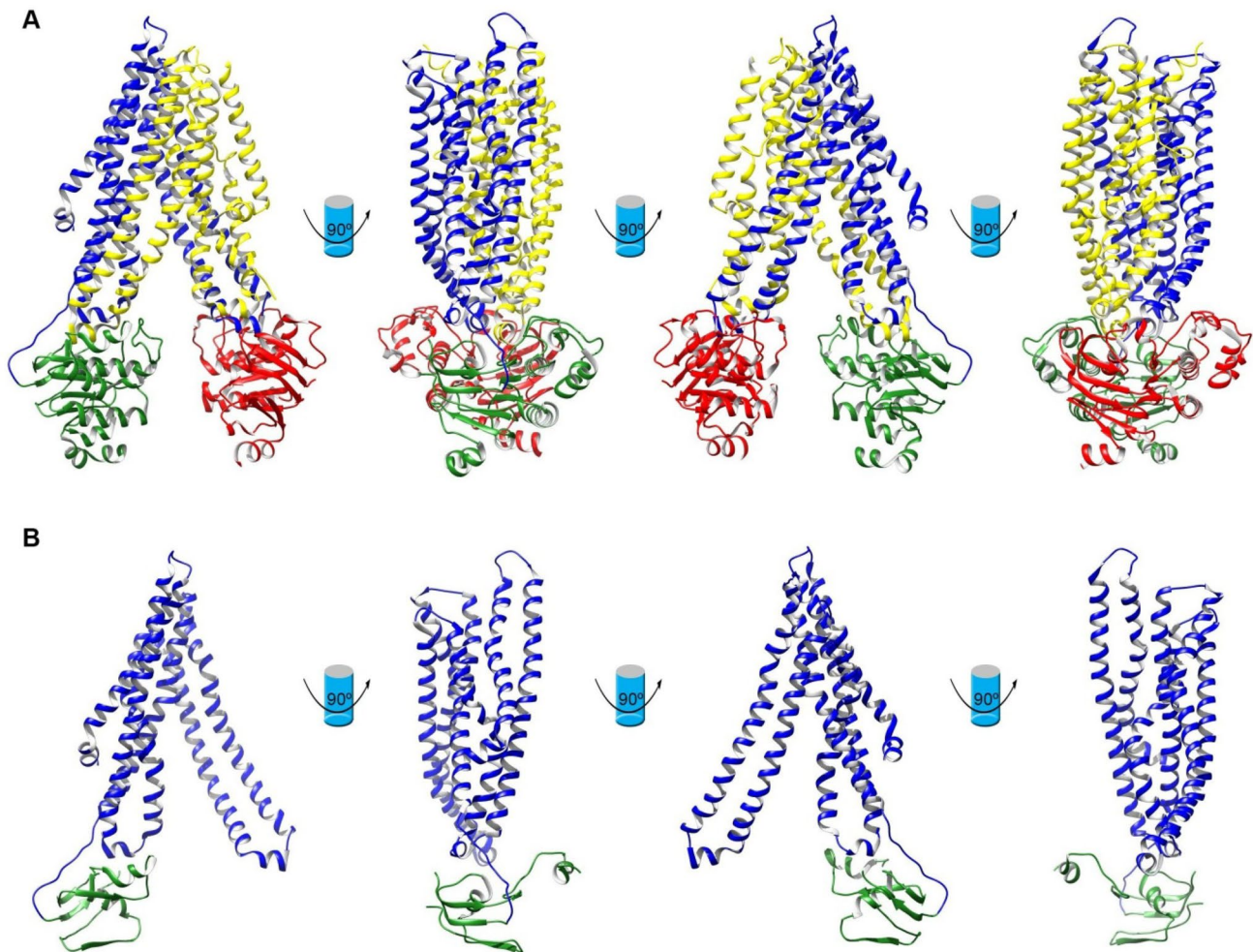


Fig. 3 CFTR three-dimensional structures. The dephosphorylated CFTR structure was modeled using the template 5UAK, from Protein DataBank [20]. The R domains are not represented. **a** Ribbon representation of the CFTR wild-type protein and **b** the CFTR S511Lfs*2

protein. The structure was rotated 90° to highlight all the faces of the protein. The functional domains TMD1 (blue), TMD2 (yellow), NBD1 (green), and NBD2 (red) are represented

silico analysis in this region showed a high conservation grade. Thus, any alterations in this domain have a deleterious impact on the protein by to affect essential regions, such as ATP-binding domain, which is essential to allow the open-closed status of the channel, and the PDZ-binding domain, that play a key role in anchoring proteins in the cell membrane [25].

Additional studies demonstrated that a single-residue deletion in the region 491–525 elicits an array of abnormalities in CFTR function [26]. Although it was found that specifically the amino acids V510 and S511 deletions did not cause problems in the processing of the CFTR protein, our data show that the new mutation S511Lfs*2 is caused by the deletion of two T nucleotides in different codons. This modification is a frameshift variant, causing the loss of the S511 amino acid and changing the reading phase, thus altering all subsequent positions within the critical region

511–525, in addition to also causing the formation of a premature codon stop.

Furthermore, this novel variant would potentially eliminate the R domain (Fig. 3), which is responsible by the channel activation and thus essential for the functionality of the protein. The loss of this domain was predicted based on sequence and structural analysis, since this domain was not resolved by the Electron Cryomicroscopy (cryo-EM) structure [20, 26].

We identified the S511Lfs*2 variant in compound heterozygosity with c.1000C>T (legacy: R334W), which represents the fourth most frequent disease-causing variant among Brazilian CF patients and leads to a mild CF phenotype (class IV) [10, 27]. The severity of the clinical features indicates that, although the S511Lfs*2 variant is associated with no CFTR protein synthesis, the c.1000C>T (legacy: R334W) variant confers the residual

CFTR channel activity, which could explain the delayed appearance of the symptoms and the late diagnosis of this patient [28, 29].

The knowledge of new variants, their classification, and mechanisms are essential to understand CF pathogenicity and drugs discovery able to correct defective proteins [10, 23]. Furthermore, *in silico* tools are a helpful strategy to predict the degree pathogenicity of the uncertain variants, as shown in this work.

Conclusions

In this study, Sanger sequencing detected a novel variant in a compound heterozygote that was confirmed by allele-specific analysis *in vitro*. The *in silico* analysis shows that S511Lfs*2 is a frameshift variant and generates a PTC which leads to the production of truncated and non-functional CFTR protein. Moreover, CF patients with this novel variant could benefit from therapies that improve the expression of full-length CFTR protein.

Acknowledgements The authors are grateful to Arnaldo Zaha for providing the laboratory facilities to carry out the allele-specific cloning assay of the novel variant.

Author contributions Thaianie Rispoli and Grazielle Rodrigues: designed the experiments, performed the experiments, analysed, and interpreted the data, drafted the manuscript, read, and approved the final manuscript. Mayara J. Prado: designed, drafted, and performed the *in vitro* allele-specific cloning, revised the manuscript, read, and approved the final manuscript. Leonardo Araújo Pinto, Marcelo Tadday Rodrigues, Cynthia Rocha Dullius: collected phenotypic data from patients, revised the manuscript, read, and approved the final manuscript. Tarciana Grandi, Cláudia Maria Dornelles da Silva, José Eduardo Vargas: revised the manuscript, read, and approved the final manuscript. Maurício Menegatti Rigo, Maria Lucia Rossetti: supervised the study, read, and approved the final manuscript.

Funding The study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, 1260-2551/13-0).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Authors declared no conflict of interest.

Ethical approval The subject enrolled in the study was a volunteer from the CF Reference Center (Hospital São Lucas da PUCRS). The study was conducted according to the 1964 Helsinki declaration and all procedures involving human subjects were approved by the Local Ethics Committee of the Hospital São Lucas – PUCRS and Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul.

Informed consent Written informed consent was obtained from the subject enrolled in the study. Declaration of consent in the study from the participant is available from the correspondence author.

References

- Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A (2015) Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Prim* 1:15010
- Gadsby DC, Vergani P, Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nat Rev* 440:477–483
- Meng X, Wang Y, Wang X, Wrennall JA, Rimington TL, Li H, Cai Z, Ford RC, Sheppard DN (2017) Two small molecules restore stability to a subpopulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with the predominant disease-causing mutation. *J Biol Chem* 292:3706–3719
- Blouquit S, Regnier A, Dannhoffer L, Fermanian C, Naline E, Boucher R, Chinet T (2006) Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174:299–305
- Zhang L, Button B, Gabriel SE 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:e1000155
- Shah VS, Meyerholz DK, Tang XX et al (2016) Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. *Science* 351:503–507
- Coakley RD, Grubb BR, Paradiso AM, Gatzky JT, Johnson LG, Kreda SM, O’Neal WK, Boucher RC (2003) Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:16083–16088
- Hwang T-C, Yeh J-T, Zhang J, Yu Y-C, Yeh H-I, Destefano S (2018) Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. *J Gen Physiol* 150:539–570
- Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD (2016) Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med* 4:e37–e38
- De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 4:662–674
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN et al (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 27:424–433
- Martins RS, Campos Junior M, dos Santos Moreira A, Marques Zembrzusi V, da Fonseca ACP, Abreu G, de Cabello M, de Cabello PH (2019) Identification of a novel large deletion and other copy number variations in the CFTR gene in patients with cystic fibrosis from a multiethnic population. *Mol Genet Genomic Med* 7:e645
- Mousquer GT, Maciel LP, Pompeu Saraiva AC, Dalla Costa ER, Rosa Rossetti ML (2018) Validation of a quick and low-cost DNA extraction protocol applicable to long-stored blood samples. *Anal Biochem* 561–562:47–51
- Rispoli T, Martins de Castro S, Grandi T, Prado M, Filippon L, Dornelles da Silva CM, Vargas JE, Rossetti LMR (2018) A low-cost and simple genetic screening for cystic fibrosis provided by the Brazilian Public Health System. *J Pediatr* 199:272–277.e3
- Yang DL, Sauvageot R, Pentoney SL (2007) DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.200900218>
- Zeugen JA, Hartley JL (1985) Ethanol precipitation of DNA. *Focus (Madison)* 7:1–2
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K et al (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 40:W597–W603
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362

20. Liu F, Zhang Z, Csanády L, Gadsby DC, Chen J (2017) Molecular structure of the human CFTR Ion channel. *Cell* 169:85–95.e8
21. Patch C, Middleton A (2018) Genetic counselling in the era of genomic medicine. *Br Med Bull* 126:27–36
22. Lejeune F (2017) Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep* 50:175–185
23. Zainal Abidin N, Haq IJ, Gardner AI, Brodli M (2017) Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother* 18:1363–1371
24. Clarke LA, Awatade NT, Felício VM et al (2018) The effect of premature termination codon mutations on CFTR mRNA abundance in human nasal epithelium and intestinal organoids: a basis for read-through therapies in cystic fibrosis. *Hum Mutat* 40:23692
25. Guggino WB (2004) The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc* 1:28–32
26. Chen X, Zhu S, Zhenin M, Xu W, Bose SJ, Wong MPF, Leung GPH, Senderowitz H, Chen JH (2019) A defective flexible loop contributes to the processing and gating defects of the predominant cystic fibrosis-causing mutation. *FASEB J* 33:5126–5142
27. Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (2016) The Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry
28. Kristidis P, Bozon D, Corey J, Danuta Markiewicz M, Rommens J, Tsui L-C, Durie P (1992) Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 50:1178–1184
29. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1993) Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362:160–164

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

6 Capítulo III

Systems biology analysis of bronchial and rectal epithelium from homozygous p.Phe508del variant patients

Thaiane Rispoli, Maria Lucia Rosa Rossetti, Joice de Faria Poloni e José Eduardo Vargas

A ser submetido à revista: *Journal of Cystic Fibrosis* (FI: 4,759)

**Systems biology analysis of bronchial and rectal epithelium from homozygous
p.Phe508del variant patients**

Thaiane Rispoli^{1,2}, Maria Lucia Rossetti^{1,3}, Joice de Faria Poloni^{4,5*}, José Eduardo Vargas^{6,7*}

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brazil;
2. Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Departamento de Ações em Saúde (DAS), Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES-RS), Porto Alegre, RS - Brazil;
3. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Porto Alegre, RS – Brazil;
4. Laboratório de Bioinformática Estrutural e Biologia Computacional, Instituto de Informática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil;
5. Laboratório de Bioinformática em Bioenergia (LBB), Embrapa Agroenergia Parque Estação Biológica, Brasília, DF – Brazil;
6. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS – Brazil;
7. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre – Brazil.

*To whom correspondence should be addressed:

Joice de Faria Poloni

ORCID: 0000-0002-3896-6404

Laboratório de Bioinformática Estrutural e Biologia Computacional

Instituto de Informática

Av. Bento Gonçalves 9500,

91501-970 - Porto Alegre, RS - Brasil

Prédio 43424 Sala 209

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, RS – Brazil

Email: joicefpoloni@gmail.com

José Eduardo Vargas

ORCID: 0000-0002-7729-5738

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Passo Fundo (UPF)

Passo Fundo, RS – Brazil

Email: josevargas@upf.br

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by wide variety of variants in the gene encoding the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein, being p.Phe508del the most prevalent CFTR variant worldwide. The CFTR is present at the apical membrane of diverse epithelial cells and functions as a regulated chloride channel, playing a critical role in the maintenance of the liquid surface layer. Although the CF patients most commonly die of respiratory-associated problems, we are beginning to understand the CFTR variants full implication in other systems. The effects of the p.Phe508del CFTR variant on each tissue's physiology continues to be not yet fully described. Our objective was then to evaluate the gene expression profile in bronchial and rectal tissues of CF patients homozygous for p.Phe508del variant. For this purpose, a system biology approach is performed. The study demonstrated that despite certain similarities in a variety of ontologies, each epithelium carries its own differences in the context of the disease. This fact must be considered in prediction diagnosis and to define precision therapeutic options for each individual with CF.

Keywords: system biology, cystic fibrosis, p.Phe508del, F508del, CFTR, protein-protein interaction.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) [OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man: #219700)] is a monogenic disease caused by more than 2,000 variants in the protein CF transmembrane conductance regulator (CFTR) [1] (<http://www.genet.sickkids.on.ca/> and <https://www.cftr2.org/>). The p.Phe508del is the most prevalent CFTR variant worldwide, responsible for approximately 70% of all CF alleles (<http://www.genet.sickkids.on.ca/> and <https://www.cftr2.org/>). This variant is caused by a 3 bp deletion in exon 10, leading to the loss of the amino acid phenylalanine at position 508 of the protein (c.1521_1523delCTT, F508del or p.Phe508del according to the current standard nomenclature) [2, 3].

The CFTR protein is located at the apical membrane of polarized epithelial cells of the respiratory tract, submucosal glands, gastrointestinal tract, exocrine pancreas, liver, sweat ducts, and reproductive tract, besides of other tissues [4]. The protein functions as a chloride channel that controls ion (Cl⁻), water secretion and absorption in epithelial tissues. Channel activation is mediated by cycles of regulatory domain phosphorylation, ATP-binding by the nucleotide-binding domains, and ATP hydrolysis [5]. The absence or dysfunction of CFTR results in an ionic imbalance, secretion of thick and dehydrated mucus, fat malabsorption, and lead to different CF phenotypes [6].

The variant's types were recently divided into seven classes, according to the mechanism by which they affect the qualitative and quantitative expression of CFTR, and according to the availability/applicability of precision medicine [7–9]. Although most of its morbidity and mortality are associated with the respiratory system, we are beginning to understand *CFTR* variants full implication in the entire gastrointestinal (GI) system. Several studies have shown that inflammation has not only a local effect, but also a systemic effect, and the improvement in the patients' clinical condition is resulting from a better understanding of the natural course of the disease, mainly from inflammation [10].

Even though a vast number of *CFTR* variants are described, there is still a lot of research to be done about the classical variant, p.Phe508del, and its effects, especially since it is so prevalent. This study aims to evaluate *in silico* the gene expression profile in bronchial and rectal tissue of CF subjects homozygous for p.Phe508del variant to contribute for a better understanding of each tissue's physiology in order to improve precision therapeutic options for each individual.

2. Methodology

2.1. Microarray analysis

To explore the main biological processes affected in CF patients, we collected two different microarray datasets at the Array Express repository under the accession number E-GEOD-15568 and E-MTAB-360, corresponding to the rectal and bronchial epithelium, respectively. Both

datasets are composed of CF patients' samples carrying the p.Phe508del mutated CFTR-allele, which were compared with the corresponding tissue of non-CF individuals. The raw data was downloaded with ArrayExpress package, and submitted to a quality analysis using the R package ArrayQualityMetrics [11, 12]. Differentially expressed genes (DEGs) analysis was performed by the R package limma, which was considered adjusted $P < 0.05$ [13].

2.2. Protein-protein interaction (PPI) network design

The differentially expressed genes of each dataset were used as input in the metasearch engine STRING 10.5 to design the protein-protein interaction (PPI) network, an individual network was created for each tissue [14]. The parameters employed were as follow: the predictions methods "experiments", "databases" and "co-expression" enabled; minimum confidence value of interactions of 0.4 and no more than 20 interactors in the first shell and no more than 5 interactors in the second shell. Non-connected nodes were retried according to the protocol mentioned above until no more connections were found. After, we merged all subnetworks in the software Cytoscape 3.7.2 [15, 16].

2.3. Centrality analysis

To assess the topological relevance of the network, a centrality analysis was performed using the Cytoscape plugin CentiScape 2.2 [17, 18]. To perform this analysis, it were considered the centrality parameters node degree and betweenness. Node degree analysis evaluates node connectivity and nodes with above-average node-degree scores are called hubs and have a central regulatory role in the cell [19]. Betweenness calculates the shortest paths connecting adjacent nodes that pass through each node. Therefore, nodes with above-average betweenness scores are called bottleneck and may have an essential role in communication between signaling mechanisms [19]. To restrict only to the network nodes with the most significant topological impact, we focus the analysis on hubs-bottleneck (HB) nodes.

2.4. Cluster analysis

To evaluate the presence and number of clusters in the PPI networks, the Cytoscape plugin MCODE 1.5.1 was employed [20]. This analysis was performed using the following parameters: degree cutoff, 2; node score cutoff, 0.2; k-core, 2; and maximum network depth, 100; haircut and fluff option were enabled with node density cutoff, 0.1. Only clusters with a score > 3 were selected for further gene ontology (GO) analysis.

2.5. Gene ontology and gene set enrichment analysis

The gene ontology (GO) analysis performed to evaluate the biological processes was conducted using Fisher's exact test, using the topGO R package [21]. GO analysis also were carried out using clusterProfile package. The analyses were made using the default settings and the *p-value* was adjusted by FDR < 0.05.

3. Results and Discussion

Gene expression profiles of rectal and bronchial epithelium of homozygous patients for the p.Phe508del variant were compared to non-CF patients, resulting in a total of 67 DEGs (60 overexpressed and 7 underexpressed) in rectal epithelium and 1176 DEGs (218 overexpressed and 958 underexpressed) in bronchial epithelium (Figure 1A e 1B).

The discrepant number of DEGs found between rectum and bronchi suggests that p.Phe508del doesn't promote similar gene expression in these tissues. In this sense, we wondered if there is an overlap of the resulting DEGs between both epithelia, presenting genes that could be differentially or commonly regulated in the explored tissues. According to this result, it was observed Interferon Stimulated Exonuclease Gene 20 (*ISG20*) and Hippocalcin Like 1 (*HPCAL1*) overexpressed in both tissues. At the same time, Solute Carrier Family 15 Member 2 (*SLC15A2*) and Ribosomal Protein L9 (*RPL9*) were underexpressed also in both epithelia (Figure 1A and 1B).

Among these four genes in common between the two epithelia, *ISG20* stands out with relevance in the context of CF. *ISG20* is a nuclear 3'-5' exonuclease with a preference for single-stranded RNA (ssRNA), implicated in the restriction mediated by type I interferon (IFN) of several RNA viruses. The host's immune responses to infection lead type I interferon (IFN) production, and positive regulation of interferon-stimulated genes (ISGs) reduces the replication and spread of the virus within a host. In bronchial epithelium, a study shows an association between the involvement of the interferon pathway (IFN) and the morbidity of Rhinoviruses (RVs) [22]. RVs are associated with exacerbation in CF, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and asthma [22]. Also, Raia *et al.* [23] detected increased infiltration of mononuclear cells in the lamina propria of specimens of the duodenal mucosa in the intestinal infection of children with CF, which resulted in increased expression of IL-2, interferon (IFN)- γ , IL-2R, ICAM-1 receptors and transferrin [23].

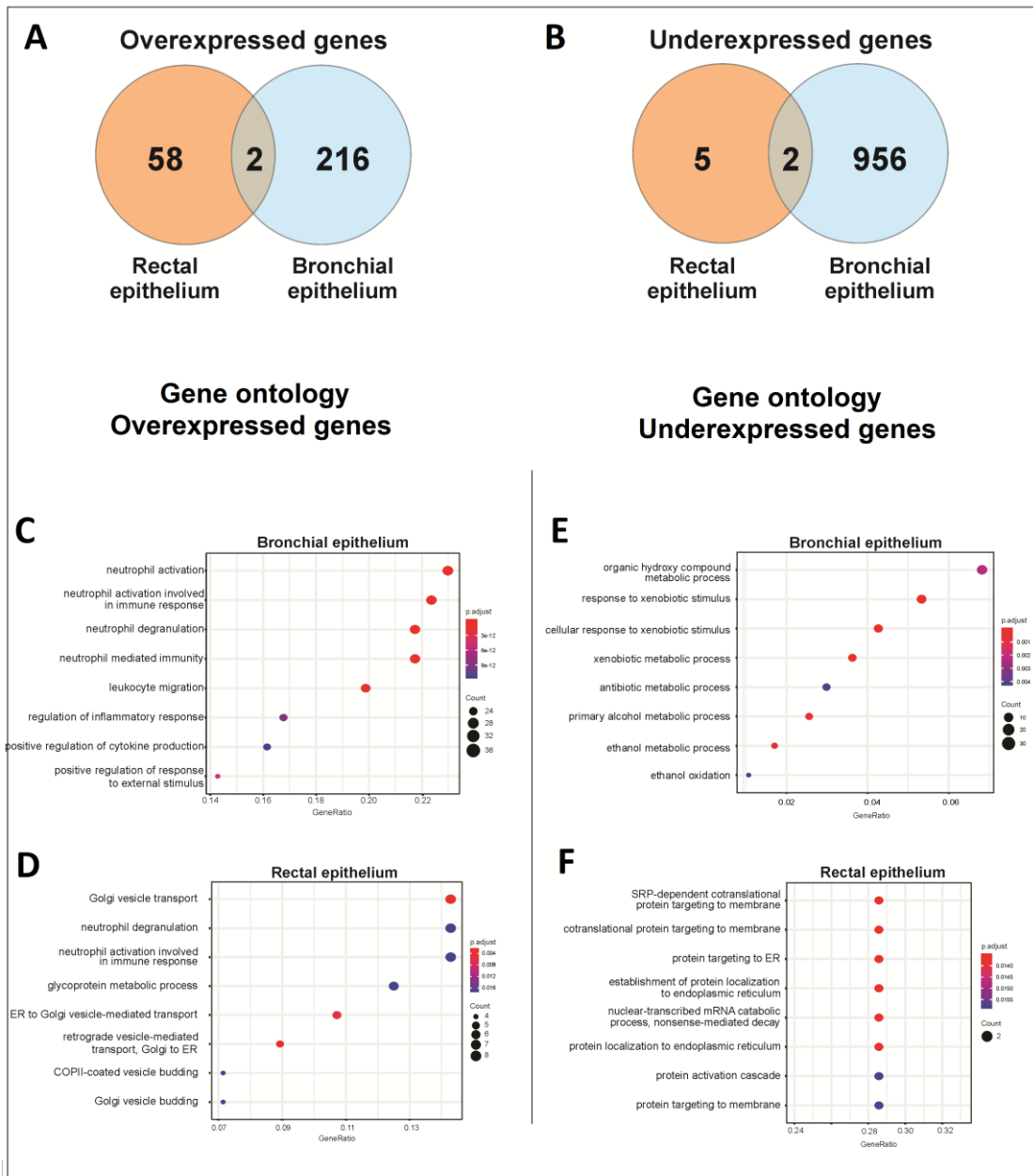


Figure 1. Venn diagram of DEGs from the rectal and bronchial epithelium, representing **(A)** overexpressed genes and **(B)** underexpressed genes. Gene ontology analyses from DEGs specifically overexpressed in **(C)** bronchial and **(D)** rectal tissue. Gene ontology analyses from DEGs specifically underexpressed in **(E)** bronchial and **(F)** rectal tissue.

Furthermore, we found 58 and 216 exclusively overexpressed genes in rectal and bronchial epithelium, respectively (Figure 1A). In bronchial epithelium, biological process for overexpressed genes was associated to neutrophil activation and degranulation, inflammatory response, leukocyte migration, and positive regulation of cytokine production (Figure 1C). On the other hand, in rectal tissue, overexpressed genes were associated to neutrophil activation and degranulation, glycoprotein metabolic process and vesicle transport, more specifically to the endoplasmic reticulum (ER) to Golgi complex, responsible for some post-translational processes, such as adding protein flags that direct them to the cell sites where they will act (Figure 1D) [24].

Additionally, we found 5 and 956 uniquely underexpressed genes in rectal and bronchial epithelium, respectively (Figure 1B). Interestingly, underexpressed genes in bronchi were represented majoritary by metabolic processes, such as xenobiotics metabolism (Figure 1E). The underexpressed DEGs present in rectal tissue were associated with the protein localization to ER, protein targeting to ER, the establishment of protein localization to ER, and cotranslational protein targeting to the membrane (Figure 1F).

To understand the biological mechanisms and to identify critical genes related to these differential regulations between the tissues, we used an interatomic approach to investigate the molecular events observed in patients with the p.Phe508del genotype. To achieve this systemic perspective of CF, firstly, a PPI network was constructed for rectum and bronchi using as input the obtained DEGs from each tissue. By characterizing networks whose backbone is structured by the DEGs found in CF, we expected to shed light on the understanding of the pathophenotypic characteristics observed in CF from a molecular perspective.

This approach resulted in a rectal network composed by 342 nodes and 2,178 edges, of which 62 are DEGs (Figure 2A), while bronchi network comprises 1,143 nodes and 8,091 edges (Figure 2B). Subsequently, topological analysis were performed for both network [25, 26]. In this sense, to clarify the main biological processes and regulatory mechanisms that may be affected as a direct or indirect consequence by the p.Phe508del mutation and CF progression, it was carried out an analysis to recognize the most densely connected regions (clusters) and the topologically most relevant nodes (HBs nodes) of bronchi and rectum networks.

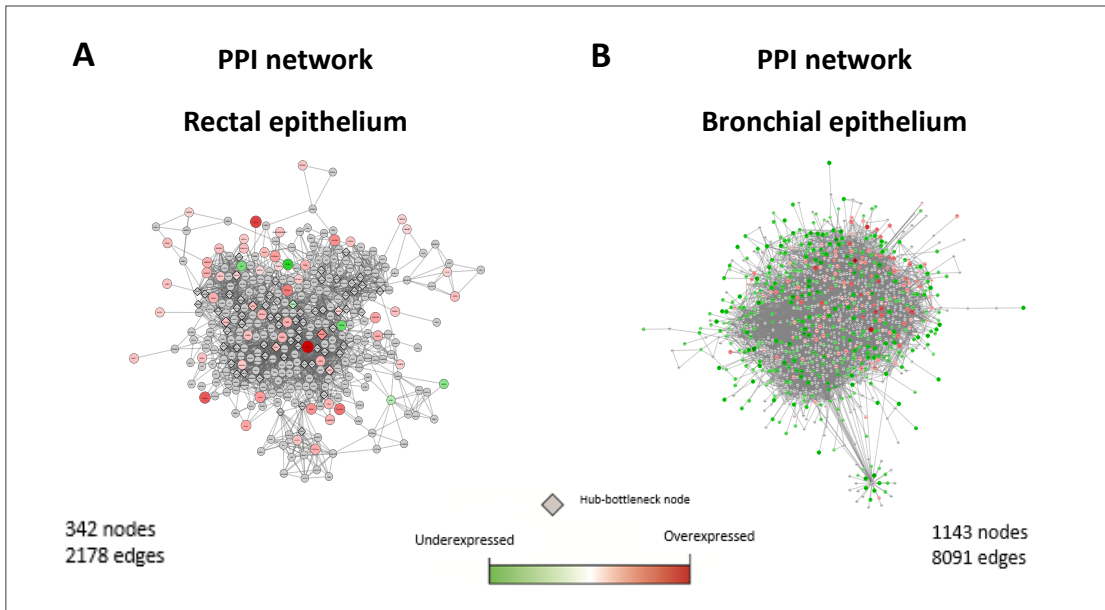


Figure 2. Protein-protein interaction network. **A)** Rectal epithelium PPI-network **B)** Bronchial epithelium PPI-network. Genes are represented by the network nodes and protein-protein association are represented by the edges. Rhombus represent the hub-bottleneck genes. Red nodes represent overexpressed genes and green nodes represent underexpressed genes.

It is known that the interaction probability of genes related to a determinate biological process is higher. It is observed an overlap between modules, suggesting the involvement of different pathways in specific process [26, 27]. Therefore, identifying the relevant nodes could help to understand the network structure and characterizes essential genes that may be responsible for its communication and integrity [27, 28].

The analysis of highly interconnected regions (clusters) in the PPI-networks of the two epithelia was performed to obtain complexes of proteins and parts of pathways. Clusters above the limit value containing more HBs genes, DEGs with higher fold-change and similar GOs were selected.

In the bronchial network, it was identified 3 major clusters and 145 HBs (22 overexpressed and 19 underexpressed) (Figure 3). These clusters were related mainly to eleven gene ontologies (Table 1). In the rectal network, clustering analysis indicated that the PPI network comprises 2 major clusters and 40 HBs (5 overexpressed) (Figure 3). The thirteen predominant biological processes observed in these clusters can be seen in Table 2.

The ontological analysis of cluster A (Figure 3A) indicated the presence of proteins related to neutrophil degranulation and chemotaxis, leukocyte migration, cytokine-mediated signaling pathway and inflammatory response, mainly through overexpressed genes. On the other hand, Cluster B (Figure 3B) presented several GOs directly connected with the positive induction of inflammation and immune response, especially in the overexpression of genes and also GOs associated with the underexpression of genes related to the organization of the extracellular matrix, pathways of integrin-mediated signaling and organization of adhesion joints. Cluster C is another relevant module (Figure 3C), associated with altered responses to oxidative stress, and a predominance of underexpressed genes. Cluster D (Figure 3D) shows the overexpression of genes involved in several intracellular mechanisms that are activated to stabilize a malformed CFTR protein in the plasma cell membrane. In cluster D, we identified five main processes, including vesicle-mediated transport, vesicle-mediated retrograde transport, protein transport, membrane organization and the inflammatory process. In cluster E there is a predominance of overexpressed genes, 3 of them HB, and 1 only underexpressed gene. Cluster E has genes related to the assembly of the anatomical structure involved in morphogenesis, signaling pathway mediated by cytokines, and cell differentiation (Figure 3E).

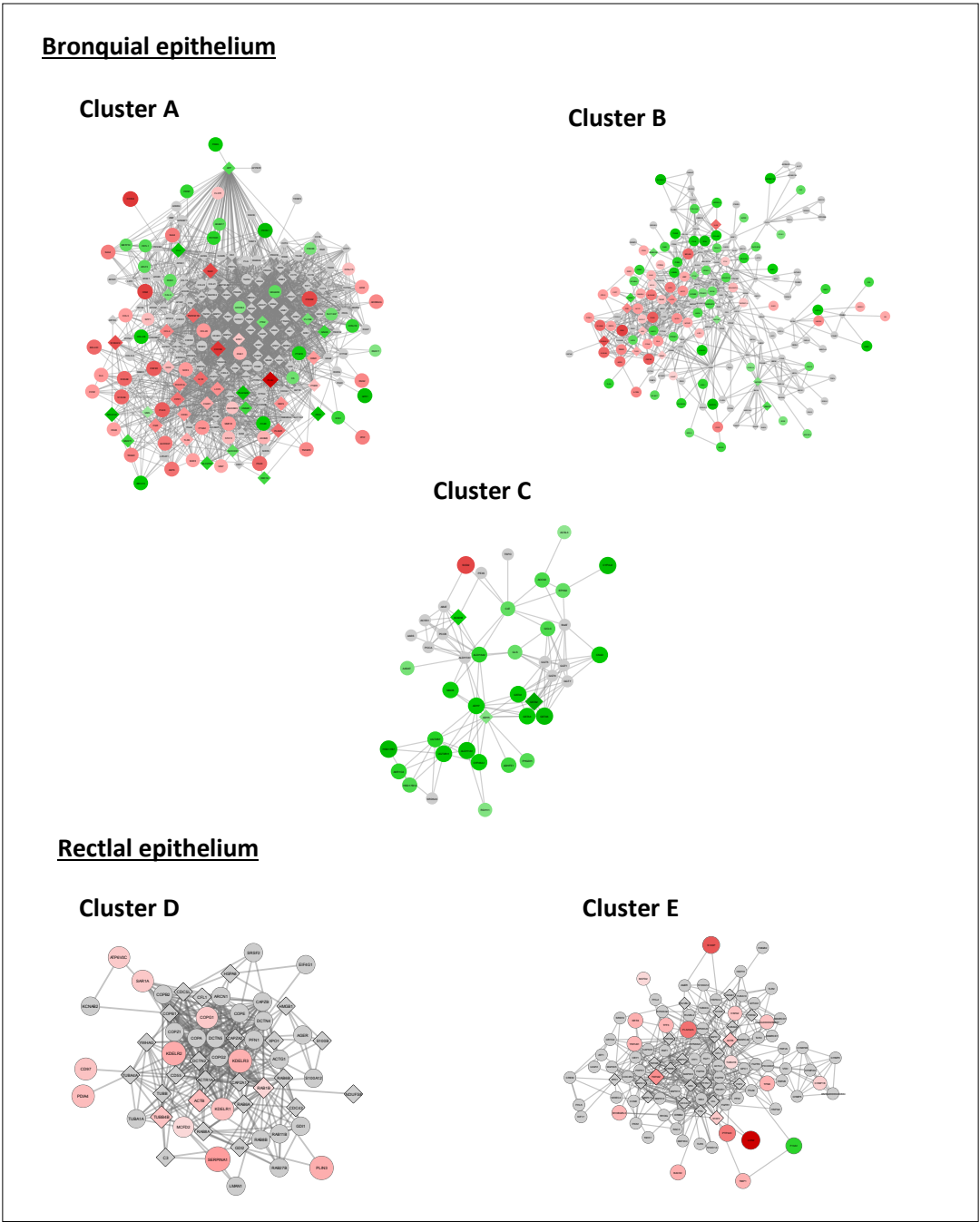


Figure 3. Representation of the main clusters found in the PPI networks in the bronchial and rectal epithelium.

Tabela 1. Enrichment analysis results according to Gene Ontology for genes selected by bronchial epithelium.

Cluster	GO ID	GO attribute	Number of genes			<i>p-value</i> ^a
			annotated	significant	expected	
A	0043312	neutrophil degranulation	84	52	16.85	2.1320E-13
	0019221	cytokine-mediated signaling pathway	117	48	23.47	1.3667E-07
	0050900	leukocyte migration	65	47	13.04	3.1816E-06
	0006954	inflammatory response	97	55	19.46	7.5692E-05
	0030593	neutrophil chemotaxis	15	14	3.01	1.5375E-04
B	0007229	integrin-mediated signaling pathway	17	10	2.36	2.2780E-03
	0030198	extracellular matrix organization	35	12	4.87	1.6141E-02
	0034332	adherens junction organization	13	7	1.81	1.6141E-02
	0006955	immune response	259	59	36.02	1.6141E-02
	0050729	positive regulation of inflammatory response	24	9	3.34	1.6141E-02
	0045576	mast cell activation	9	6	1.25	1.6141E-02
C	0006805	xenobiotic metabolic process	21	8	0.85	9.1160E-03
	0006749	glutathione metabolic process	11	9	0.45	6.7844E-05
	0055114	oxidation-reduction process	84	19	3.42	3.0817E-04

^a *p-values* were adjusted by FDR < 0.05

Tabela 2. Enrichment analysis results according to Gene Ontology for genes selected by rectal epithelium.

Cluster	GO ID	GO attribute	Number of genes			<i>p-value</i> ^a
			annotated	significant	expected	
D	0006890	retrograde vesicle-mediated transport Golgi to ER	14	14	2.47	1.1550E-10
	0043312	neutrophil degranulation	33	13	5.82	5.2150E-03
	0015031	protein transport	72	25	12.71	8.6917E-03
	0016192	vesicle-mediated transport	95	44	16.76	3.6283E-02
	0061024	membrane organization	31	12	5.47	4.3490E-02
E	0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	36	25	11.59	1.7670E-03
	1905477	positive regulation of protein localization to membrane	11	9	3.54	7.8275E-03
	0001894	tissue homeostasis	10	8	3.22	1.0390E-02
	0030154	cell differentiation	97	57	31.23	1.0390E-02
	0051050	positive regulation of transport	36	23	11.59	1.0390E-02
	0097237	cellular response to toxic substance	5	5	1.61	1.0390E-02
	0042742	defense response to bacterium	9	7	2.9	1.7198E-02
	0019221	cytokine-mediated signaling pathway	44	17	14.17	3.3047E-02

^a *p-values* were adjusted adjusted by FDR < 0.05

CF is a multisystem disease characterized by chronic, life-threatening inflammation and recurrent infection of the lungs. The defective immune response and altered mucus viscosity and acidity pave the way for persistent opportunistic microbial colonization and tissue damage [29, 30]. In gastrointestinal tract (GI), the pathological consequences resulting from dysregulation or absence of CFTR, such as meconium ileus, intestinal obstruction syndromes, rectal prolapse, dysmotility, colon cancer and secretory diarrhea are some manifestations observed in cystic fibrosis that highlight the critical role of CFTR in the mechanisms of the GI [31–34]. Next, we highlight the gene expression profile in some of the main biological processes and pathways that best explain essential aspects and insights of CF (p.Phe508del variant) affecting the bronchial and rectal epithelia.

Inflammatory process, oxidative stress, and gastrointestinal cancer

Our data showed the overexpression of the protein Calgranulin C (S100A12, hub-bottleneck - HB) in bronchial epithelium, a calcium-, zinc-, and copper-binding protein that plays a prominent role in inflammatory processes and the immune response. Its pro-inflammatory activity involves the recruitment of leukocytes, promoting cytokine and chemokine production, and regulating of leukocyte adhesion and migration [35]. Interestingly, S100A12 is widely expressed at sites of lung inflammation in CF [36]. It is a serum marker of the airways' acute infectious exacerbations, being an essential target for anti-inflammatory treatments [36]. Two other overexpressed proteins (Calgranulin A, S100A8 and Calgranulin B, S100A9) are also described to accumulate in the inflammation sites and are found at high levels in CF [36].

CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) and interleukin 1 Beta (IL-1B) proteins, both HBs, were overexpressed in bronchus. CXCR4 is the predominant chemokine receptor in human fibrocytes that are involved in the tissue healing process with the production of collagen fibers. Chemokines are part of a specialized family of cytokines, which function as potent mediators or regulators of inflammation, due to recruiting and activating specific leukocyte subpopulations [37]. Xie L *et al.* shows high fibrocyte circulation in CF, especially when there is chronic fungal colonization by *Aspergillus fumigatus*, that triggers allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), one of the main respiratory complications in CF [38]. *IL-1B* is considered one of the most important the inflammatory response markers and is considered indirect cystic fibrosis modifying gene associated with disease severity [39]. *IL-1B* induces the secretion of MUC5B (Mucin-5 Subtype B, Tracheobronchial) and MUC5AC (Mucin-5 Subtype AC, Tracheobronchial) proteins and hyper-concentration in bronchial epithelial cells in CF patients [40]. These proteins are the predominant gel-forming mucins in the human airways' mucus layer that facilitate the invasion and proliferation of bacteria [41].

Directly related to cytokine production regulation in epithelial cells from endothelial cells, *OSM* gene (oncostatin-M) is another bronchus overexpressed gene having a pro-inflammatory

role [42]. *OSM* contributes to the accumulation of profibrotic macrophages and increased pulmonary fibrosis induced by bleomycin toxicity [43].

Three genes that encode cytosolic components of the NADPH multimeric complex are overexpressed in bronchial epithelium: *NCF1*, *NCF2* and *NCF4* (Neutrophil Cytosolic Factor 1, 2 and 4 respectively). The best characterized NADPH oxidase is phagocytic, present in macrophages and neutrophils [44]. Under normal circumstances, the NADPH oxidase complex is latent in neutrophils and macrophages and is activated, mounting on the phagosome membrane during the respiratory burst [45–49]. NADPH oxidase generates superoxide by transferring electrons from intracellular NADPH across the membrane, coupling them to molecular oxygen, forming the superoxide anion, a reactive free radical [45–49]. Superoxide can be produced in phagosomes, containing ingested bacteria and fungi, or it can be produced outside the cell burst [45–49]. In a phagosome, the superoxide can spontaneously form hydrogen peroxide, which will undergo [50]subsequent reactions generating several reactive oxygen species (ROS) [44]. The abundant recruitment of neutrophils in the lung is a fundamental feature of bacterial infections in CF patients. In response to infection, inflammatory neutrophils release reactive oxygen species (ROS) and toxic proteins, leading to aggravated lung tissue damage in CF patients [51].

Overexpression of the mitochondrial superoxide dismutase 2 gene (*SOD2*), a powerful mitochondrial antioxidant, is observed, and the set of genes (*GSTA1*, *GSTA3* and - *GSTA2* hub-bottleneck), that are involved in the activity of glutathione S-transferase (GST), are underexpressed, both in bronchial epithelium and belonging to the same cluster. *SOD2* binds to superoxide byproducts and converts them to hydrogen peroxide (H_2O_2) and diatomic oxygen (O_2) [52]. Oxidative stress results in deleterious cell function in pathologies associated with inflammation [53]. At mitochondria, according to [54] reactive oxygen species (ROS) levels are increased in airway diseases, including CF, but the origin and consequences of high ROS levels are not fully understood. The expression of *SOD2* is seen as a compensatory mechanism [55]. Concerning the underexpression of glutathione S-transferases (GSTs), genes *GSTA1*, *GSTA2* (HB) and *GSTA3*, these encode enzymes that catalyze glutathione conjugation to lipophilic xenobiotics [56]. Glutathione is an antioxidant tripeptide that plays an essential role in protecting epithelial cells against oxidant stress and xenobiotics [57]. The cytoplasmic levels of glutathione rapidly increase in epithelial cells exposed to oxidative stress [58]. Glutathione facilitates xenobiotic metabolism, while Glutathione S-transferase enzymes catalyze its conjugation to lipophilic xenobiotics, facilitating their excretion or further metabolism [56]. Epithelial mucous membranes are repeatedly exposed to oxidants and xenobiotics. CFTR can mediate the antioxidant glutathione membrane permeability and plays a role in its transepithelial flux and in defining the hydration and viscoelasticity of protective mucus [59, 60]. Individuals with lung diseases associated with altered antioxidant transport, such as cystic fibrosis, might lack the ability to adapt to the infection and present with a more severe inflammatory response [61]. The observed underexpression of glutathione S-transferases (GSTs), *GSTA1*, *GSTA2* and *GSTA3*, may be due to the increased role in protecting epithelial cells against oxidant stress and the altered antioxidant transport through CFTR in the metabolism of xenobiotics.

CFTR influences several interrelated processes in the intestine that are critical for tissue homeostasis. These include the composition of intestinal microflora, maintenance of essential barriers that protect the epithelial cell layer and homeostasis in the innate, and adaptive immune response [31]. The clinical manifestations of CF in the GI tract, such as inflammation and obstruction, are associated with the dysregulation of these processes. These events further create a favorable scenario for the development of cancer [62].

Our results demonstrate an overexpression of the serpin family A member 1 gene (*SERPINA1* or *A1AT*) in rectal epithelium, that encodes the alpha-1-antitrypsin protein, that inhibits trypsin, a serine protease, that helps in the digestion process [63]. In the small intestine, trypsin breaks down proteins, continuing the digestion process that began in the stomach. It may also be referred to as a proteolytic enzyme or proteinase. In this context, an overexpression of *SERPINA1* causes digestive deficiency, which in CF individuals is characterized by malabsorption of essential nutrients leading to malnutrition and anemia [64]. Moreover, the activation of trypsin from proteolytic cleavage of trypsinogen in the pancreas can lead to a series of events that cause pancreatic self-digestion, resulting in pancreatitis. One consequence of CF is a deficiency in the transport of trypsin and other digestive enzymes from the pancreas. This leads to the disorder termed meconium ileus, that involves intestinal obstruction (ileus) due to overly thick meconium, which is normally broken down by trypsin and other proteases, then passed in feces. In addition, *SERPINA1* is considered an indirect modifier of CF in the phenotype of liver disease [39]. Still related to the inflammatory process in rectum, the ATP6V0C is a multisubunit enzyme that mediates acidification of eukaryotic intracellular organelles (ATPase H⁺ Transporting V0 Subunit C) appears overexpressed. This enzyme activates zymogens such as IL-1B and trypsinogen, pro-inflammatory, released by neutrophils.

Regarding the cytokine-mediated signaling pathway, overexpression of Phospholipase A2 group IIA (*PLAG2G2A*) and Lipocalin 2 or Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (*LCN2* or *NGAL*) were observed in rectal epithelium. Studies demonstrate that *PLAG2G2A* has a role in defense of the host against invading pathogens, and its expression is induced during bacterial infections, with a significant increase in conditions of inflammatory bowel diseases (IBD) [65, 66]. The release of *PLAG2G2A* is induced by inflammatory cytokines, such as interleukin IL-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF- α), which are key factors in the process of adhesion and migration of neutrophils [66]. The *NGAL* plays a role in innate immunity, limiting bacterial growth due to the sequestration of iron-containing siderophores [67]. Lipocalin is a highly specific marker for acute exacerbation in cystic fibrosis [68]. In inflammatory diseases and human colorectal cancer (CRC), an impaired mucosal barrier function can result in the absorption of bacterial products from the intestinal lumen. These products can recruit inflammatory cells and thus increase the inflammatory response and overexpression of *LCN2* [69, 70].

The longevity of CF patients has recently increased, due to early diagnosis and modern ways of treatment, and permitted to observe an increased risk of aggressive colorectal cancer in comparison with individuals of the same age without CF [62, 71, 72]. The disruption of physical

barriers in the intestine caused by illicit contact of bacteria can also alter migration and invasion of cancer cells [62]. Dysbiosis resulting from loss of CFTR promotes the bacterial growth in colorectal cancer [62].

CFTR loss has been associated with NF- κ B activation [62]. In the present study, overexpression of *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) was detected in rectal epithelium. Both NF- κ B and *STAT3* are rapidly activated in response to various stimuli including stresses and cytokines [73]. Once activated, NF- κ B and *STAT3* control the expression of anti-apoptotic, pro-proliferative and immune response genes. Some of these genes overlap and require transcriptional cooperation between the two factors. The activation of and interaction between *STAT3* and NF- κ B plays a key role in controlling the dialog between the malignant cell and its microenvironment, especially with inflammatory/immune cells that infiltrate tumors. *STAT3* constitutive activation has been observed in several tumor-derived cell lines being transcription factor that regulate the expression of certain immune system genes [74]. Moreover, *STAT3* is considered an indirect modifier of CF considering the intestine phenotype [39]. Persistent activation of *STAT3* in colon cancer is associated with increased cell proliferation and tumor growth [75]. Also with participation in the NF- κ B signaling pathway [76–80], the HB *YWHAZ* gene (Tyrosine 3-Monooxygenase / Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) is overexpressed in rectal epithelium. Studies show that *YWHAZ* is often positively regulated in several types of cancer, such as colorectal [76–80].

There was also overexpression in rectal epithelium of Protein Tyrosine Phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), part of the family of protein tyrosine phosphatases (PTPs), which are cell signaling molecules that perform regulatory functions in a variety of cellular processes, including cell proliferation and migration. PTP4A1 has been shown to play an essential stimulating role in carcinogenesis, including the Rho GTPases family in colorectal carcinoma [81, 82].

Vesicle-mediated protein transport and quality control systems

Processes regarding vesicle-mediated transport, vesicle-mediated retrograde transport, protein transport, and membrane organization have been found mainly in rectal epithelium [83]. Overexpression of cellular transport and folding machinery is possibly demanded because of misfolded CFTR protein. Hereafter we present the gene expression profile concerning these ontologies.

Overexpression of the *COPG1* (COPI Coat Complex Subunit Gamma 1) gene was observed, which belongs to the COPI coatomer complex family. According to literature, the COPI complex is involved in the machinery of "quality control" of proteins that had their maturation and folding premature or impaired [83, 84]. These proteins are then signaled with a sequence of KDEL amino acids (lys-asp-glu-leu) [24]. This process is mediated by an endoplasmic reticulum protein retention receptors that recognize and bind to the protein that contains the tetra-peptide, returning

it to the endoplasmic reticulum. These receptors are the proteins encoded by *KDELR1*, *KDELR2*, *KDELR3*, which were found to be overexpressed in our study.

The KDEL receptor binding to the KDEL signal peptide triggers the incorporation of the receptor-protein complex into COPI-coated vesicles, that return the complex back to the ER [85]. Once in the ER, the receptor-protein complex dissociates into a complex regulated by the pH difference between ER (neutral pH) and Golgi (slightly acidic pH) [86]. This pH change is mediated by the vacuolar ATPase enzyme (V-ATPase). In our study, overexpression of the *ATP6V0C* gene was observed, a subunit of the integral V0 complex of the vacuolar ATPase membrane. The empty KDEL receptor leaves the ER in the COPII vesicles (anterograde via), returning to the Golgi for new attempts of recovery [24].

There was also overexpression of the HB RAB1b (Member RAS Oncogene Family), essential for transporting vesicles between the ER and Golgi [87]. It is a member of the RAB protein family, a monomeric GTPases that hydrolyze guanosine-5'-triphosphate used as an energy source in the translation extension stage [88]. In mammalian cells, COPI recruitment has been demonstrated *in vivo* by inactive Rab1b (Rab1bN121I) expression. This blocked the transport of proteins from the ER to the Golgi, causing the Golgi rupture, inducing the reallocation of resident Golgi proteins to the ER [88].

Likewise, *SAR1A* (Secretion Associated Ras Related GTPase 1A) was overexpressed, a small GTPase with transport function between RE and Golgi [89]. The response of the ER is triggered by the accumulation of abnormal folding proteins concomitant with the increased expression of protein disulfide isomerase family A member 4 (PDIA4) seen in this cluster. PDIA4 is a member of the disulfide isomerase (PDI) family of ER proteins, which catalyze protein folding [90].

HSPA2 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 2) is a protein coding gene, overexpressed. It encodes a molecular chaperone involved in a wide variety of cellular processes, including proteome protection from stress, folding and transport of polypeptides [91]. The responses of the proteins HSPA2 are induced by the expression of the p.Phe508del variant in the *CFTR* [92].

Protein localization to membrane and tissue homeostasis

In bronchial epithelia it was observed the overexpression of HB gene plasminogen activator urokinase (*PLAU*), that converts plasminogen to plasmin. Plasmin is an important enzyme present in the blood that breaks down many blood plasma proteins, especially fibrin clots. This process is called fibrinolysis. Individuals with CF have hemoptysis, a common complication in the context of a respiratory infection. This comorbidity consists of the expectoration of blood from the lungs or tracheobronchial tree and can be explained by increased plasmin levels in the blood [93, 94].

Also in the bronchus, it was found an underexpression of gene tyrosine kinase 2 (*PTK2* or *Pyk2*), also known as focal adhesion kinase (*FAK*), a hub-bottleneck that plays an essential role mainly in the phosphorylation of protein substrates, regulation of cell migration, adhesion, reorganization of the actin cytoskeleton, formation and disassembly of focal adhesions [95]. CFTR protein, like other members of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, has the activity of its channel regulated by the binding and hydrolysis of ATP molecules by the nucleotide-binding domains (NBDs) [96, 97]. The CFTR catalytic activity is initiated and regulated by phosphorylation of its regulatory region or R domain. Pyk2 can phosphorylate CFTR on tyrosine residues and activate chloride currents [98]. Thus, the underexpression of *Pyk2* found in this cluster can be explained by the CFTR protein's poor conformation in this binding region.

Two integrin genes belonging to alpha (*ITGA2*) and beta (*ITGB5*) subunits are also underexpressed in bronchus. Integrins are transmembrane receptors that facilitate the adhesion of the cellular extracellular matrix (ECM) [99, 100]. After ligand binding, integrins activate signal transduction pathways that mediate cellular signals, such as regulation of the cell cycle, organization of the intracellular cytoskeleton and movement of new receptors on the cell membrane [99, 100]. The presence of integrins allows rapid and flexible responses to events on the cell surface (for example, platelet signaling pathways to initiate an interaction with clotting factors in the halt of the hemorrhagic process) [100, 101]. The results corroborate the fact that individuals with CF and injured pulmonary epithelium have less hemorrhagic stagnation, especially in the context of respiratory infection [94].

In rectum it was observed an overexpression of genes that encode proteins related to the cytoskeleton: Actin Beta (*ACTB*) and Keratin Protein 8 (*KRT8*). *ACTB* is a HB gene related to greater stability of the membrane [102, 103], and its overexpression may be a response to stabilize misfolded CFTR protein in the membrane. It is known that cytoskeletal proteins, previously considered only as structural proteins, are also important factors in regulating cellular processes and functions [104]. *KRT8* is part of an intermediate filament protein in the epithelial cell cytoplasm [104]. Studies reveal that this *KRT8* protein interacts with the nucleotide binding domain 1 (NBD1) of the CFTR with phenylalanine deletion at position 508 (p.Phe508del variant), and this interaction hampers the biogenesis of p.Phe508del and its insertion into the plasma membrane [105, 106]. The interruption of this interaction may constitute a new therapeutic target for CF patients with the p.Phe508del variant [106]. Due to that, *KRT8* is considered a direct modifier gene of CF severity [39].

Still on rectal epithelia, Coagulation Factor XIII A subunit (*F13A1*) gene is underexpressed. The *F13A1* gene is involved in the fibrin clot stabilization, and its reduction leads to a deficiency in the healing of epithelia and bleeding [107, 108]. *F13A1* activation depends on thrombin [109]. Prothrombin is converted to thrombin by Coagulation Factor Xa, a vitamin K-dependent glycoprotein. Malabsorption of fat and fat-soluble vitamins (A, D, E, K) occur in CF patients [107]. Vitamin K2 (menaquinone) is produced by intestinal bacteria, but production can be reduced by frequent use of antibiotics and eradication of normal intestinal flora in CF patients.

Vitamin K deficiency decreases liver production of clotting factors dependent on this vitamin and predisposes CF patients to easy bruising, bleeding and potentially life-threatening hemorrhage [110].

4. Conclusion

In this study, both bronchial and rectal tissues have shown an overexpression of ontologies related to proinflammatory and immune response processes, characteristics commonly observed in CF patients. On the other hand, ontologies related to cell differentiation and regulation of vesicle-mediated transport have been observed mainly in the rectal epithelium.

The study suggests that despite certain similarities in a variety of ontologies, each epithelium carries its own differences in the context of the disease, what could be due to the presence of p.Phe508del variant, epigenetic and environmental factors. These facts must be considered in diagnosis prediction and precision therapeutic approaches for each individual with CF.

5. References

1. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 45:1160–1167
2. Wiederschain GY (2002) The metabolic and molecular bases of inherited disease. *Biochem* 67:611
3. Morales MM, Capella MAM, Lopes AG (1999) CFTR structure and function.
4. Derichs N (2013) Targeting a genetic defect: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 22:58–65
5. Zhang Z, Liu F, Chen J (2018) Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:12757–12762
6. Castellani C, Assael BM (2017) Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci* 74:129–140
7. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD (2016) Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med* 4:e37–e38
8. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD (2017) Personalized or precision medicine? The example of cystic fibrosis. *Front Pharmacol*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00390>

9. De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 4:662–674
10. Bernardi DM, Ribeiro AF, Mazzola TN, Vilela MMS, Sgarbieri VC (2013) The impact of cystic fibrosis on the immunologic profile of pediatric patients ☆. *J Pediatr (Rio J)* 89:40–47
11. Kauffmann A, Rayner TF, Parkinson H, Kapushesky M, Lukk M, Brazma A, Huber W (2009) Importing ArrayExpress datasets into R/Bioconductor. *Bioinformatics* 25:2092–2094
12. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W (2009) arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* 25:415–416
13. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47
14. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al (2015) STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43:D447–D452
15. Cline SM, Smoot M, Cerami E, et al (2007) Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2:2366–2382
16. Kaphingst KA, Persky S, Lachance C (2010) BIOLOGICAL NETWORK EXPLORATION WITH CYTOSCAPE 3. <https://doi.org/10.1080/10810730902873927>. Testing
17. Scardoni G, Tosadori G, Faizan M, Spoto F, Fabbri F, Laudanna C (2015) Biological network analysis with CentiScaPe: centralities and experimental dataset integration. *F1000Research* 1–9
18. Scardoni G, Petterlini M, Laudanna C (2009) Analyzing biological network parameters with CentiScaPe. *Bioinformatics* 25:2857–9
19. Scardoni G, Laudanna C (2012) Centralities Based Analysis of Complex Networks. In: *New Front. graph thory*. pp 323–348
20. Bader GD, Hogue CW V (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 4:2
21. Alexa A (2007) Gene set enrichment analysis with topGO. R Packag. version 2.37.0.
22. Schögler A, Stokes AB, Casaulta C, Regamey N, Edwards MR, Johnston SL, Jung A, Moeller A, Geiser T, Alves MP (2016) Interferon response of the cystic fibrosis bronchial epithelium to major and minor group rhinovirus infection. *J Cyst Fibros* 15:332–339
23. Raia V, Maiuri L, De Ritis G, De Vizia B, Vacca L, Conte R, Auricchio S, Londei M (2000) Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic

- fibrosis patients. *Pediatr Res* 47:344–350
24. Bikard Y, Viviano J, Orr MN, Brown L, Brecker M, Jeger JL, Grits D, Suaud L, Rubenstein RC (2019) The KDEL receptor has a role in the biogenesis and trafficking of the epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem* 294:18324–18336
 25. Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, Barabási AL (2015) Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science* (80-) 347:841
 26. Loscalzo J, Barabasi AL (2011) Systems biology and the future of medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3:619–627
 27. Furlong LI (2013) Human diseases through the lens of network biology. *Trends Genet* 29:150–159
 28. Barabási AL, Oltvai ZN (2004) Network biology: Understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 5:101–113
 29. Bruscia EM, Bonfield TL (2016) Innate and Adaptive Immunity in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med* 37:17–29
 30. Mingione A, Ottaviano E, Barcella M, Merelli I, Rosso L, Armeni T, Cirilli N, Ghidoni R, Borghi E, Signorelli P (2020) Cystic Fibrosis Defective Response to Infection Involves Autophagy and Lipid Metabolism. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9081845>
 31. Reed MD A, Shores MD, PHD D (2020) Gastrointestinal manifestations of cystic brosis: A primer for pediatricians. *Contemp Pediatr* 37:12–16
 32. Gelfond D, Borowitz D (2013) Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11:333–342
 33. Barrett KE (2000) New insights into the pathogenesis of intestinal dysfunction: Secretory diarrhea and cystic fibrosis. *World J Gastroenterol* 6:470–474
 34. Van Der Doef HPJ, Kokke FTM, Van Der Ent CK, Houwen RHJ (2011) Intestinal obstruction syndromes in cystic fibrosis: Meconium ileus, distal intestinal obstruction syndrome, and constipation. *Curr Gastroenterol Rep* 13:265–270
 35. Meijer B, Geary RB, Day AS (2012) The role of s100a12 as a systemic marker of inflammation. *Int J Inflam*. <https://doi.org/10.1155/2012/907078>
 36. Foell D, Seeliger S, Vogl T, Koch HG, Maschek H, Harms E, Sorg C, Roth J (2003) Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax* 58:613–617
 37. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM (2011) The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. *Acta Med Port* 24:967–976

38. Xie L, Zhao L (2017) Role of CXCL12/CXCR4-Mediated Circulating Fibrocytes in Pulmonary Fibrosis. *J Biomed* 2:134–139
39. Gallati S (2014) Disease-modifying genes and monogenic disorders: Experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 7:133–146
40. Chen G, Sun L, Kato T, et al (2019) IL-1 β dominates the promucin secretory cytokine profile in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 129:4433–4450
41. Okuda K, Chen G, Subramani DB, et al (2019) Localization of secretory mucins MUC5AC and MUC5B in normal/healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 199:715–727
42. Richards CD, Botelho F (2019) Oncostatin M in the regulation of connective tissue cells and macrophages in pulmonary disease. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7040095>
43. Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R (2002) Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 83:111–119
44. Rabêlo LA, Nunes De Souza V, Sá Da Fonseca LJ, Sampaio WO Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control.
45. Ogawa K, Suzuki K, Mitsuharu O, Yamazaki K, Shinkai S (2008) The association of elevated reactive oxygen species levels from neutrophils with low-grade inflammation in the elderly. *Immun Ageing*. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-13>
46. James PE, Grinberg OY, Swartz HM (1998) Superoxide production by phagocytosing macrophages in relation to the intracellular distribution of oxygen. In: *J. Leukoc. Biol. Federation of American Societies for Experimental Biology*, pp 78–84
47. Tarafdar A, Pula G (2018) The role of NADPH oxidases and oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 19:3824
48. Nguyen GT, Green ER, Meccas J (2017) Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 7:373
49. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S (2015) NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol* 12:5–23
50. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O (2013) ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol* 94:657–670
51. Robledo-avila FH, Ruiz-rosado JDD, Brockman KL, Amer AO, Mccoy K, Bakaletz LO, Partida- S (2018) Dysregulated calcium homeostasis in cystic fibrosis neutrophils leads to deficient antimicrobial responses Frank. *J Immunol* 201:2016–2027
52. Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St. Clair DK (2011) Manganese superoxide dismutase: Guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci* 12:7114–7162

53. Rottner M, Tual-Chalot S, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Freyssinet JM, Martínez MC (2011) Increased oxidative stress induces apoptosis in human cystic fibrosis cells. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024880>
54. Valdivieso AG, Santa-Coloma TA (2013) CFTR activity and mitochondrial function. *Redox Biol* 1:190–202
55. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC (1999) Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4820–4825
56. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88
57. Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* Vol. 52:711–760
58. Rahman I, MacNee W (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16:534–554
59. Cantin AM, Bilodeau G, Ouellet C, Liao J, Hanrahan JW (2006) Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am J Physiol - Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2005>
60. Linsdell P, Hanrahan JW (1998) Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol - Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.1.c323>
61. Day BJ, Van Heeckeren AM, Min E, Velsor LW (2004) Role for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in A Glutathione Response to Bronchopulmonary Pseudomonas Infection. *Infect Immun* 72:2045–2051
62. Scott P, Anderson K, Singhania M, Cormier R (2020) Molecular Sciences Cystic Fibrosis, CFTR, and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 21:2891
63. Boëlle PY, Debray D, Guillot L, Corvol H (2019) SERPINA1 Z allele is associated with cystic fibrosis liver disease. *Genet Med* 21:2151–2155
64. El-Diery W, Metz D, Schmid RM, Witt H, Apte M V, Keim V, Wilson JS (2007) Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology* 132:1557–1573
65. Dore E, Boilard E (2019) Roles of secreted phospholipase A 2 group IIA in inflammation and host defense. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1864:789–802
66. Tan TL, Goh YY (2017) The role of group IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2-IIA) as a biomarker for the diagnosis of sepsis and bacterial infection in adults—A systematic review. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180554>
67. Nasioudis D, Witkin SS (2015) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol* 204:471–479

68. Eichler I, Nilsson M, Rath R, Enander I, Venge P, Koller DY (1999) Human neutrophil lipocalin, a highly specific marker for acute exacerbation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 14:1145–1149
69. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L (1996) Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 38:414–420
70. Dayama G, Priya S, Niccum DE, Khoruts A, Blekhman R (2020) Interactions between the gut microbiome and host gene regulation in cystic fibrosis. *Genome Med.* <https://doi.org/10.1186/s13073-020-0710-2>
71. Hadjiliadis D, Khoruts A, Zauber AG, et al (2018) Cystic Fibrosis Colorectal Cancer Screening Consensus Recommendations. *Gastroenterology* 154:736-745.e14
72. Niccum DE, Billings JL, Dunitz JM, Khoruts A (2016) Colonoscopic screening shows increased early incidence and progression of adenomas in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 15:548–553
73. Grivennikov SI, Karin M (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:11–19
74. Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I (2006) Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* 15:1445–1451
75. Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, et al (2005) Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia* 7:545–555
76. Zhao JF, Zhao Q, Hu H, Liao JZ, Lin JS, Xia C, Chang Y, Liu J, Guo AY, He XX (2018) The ASH1-miR-375-YWHAZ Signaling Axis Regulates Tumor Properties in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther - Nucleic Acids* 11:538–553
77. Li Y, Wang J, Dai X, et al (2015) miR-451 regulates FoxO3 nuclear accumulation through Ywhaz in human colorectal cancer. *Am J Transl Res* 7:2775–85
78. Tong S, Xia T, Fan K, Jiang K, Zhai W, Li JS, Wang SH, Wang JJ (2016) 14-3-3ζ promotes lung cancer cell invasion by increasing the Snail protein expression through atypical protein kinase C (aPKC)/NF-κB signaling. *Exp Cell Res* 348:1–9
79. Wang W, Zhang L, Wang Y, et al (2017) Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer. *Cell Death Dis* 8:e3071
80. Gan Y, Ye F, He XX (2020) The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges. *J Cancer* 11:2252–2264
81. Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD (2006) PRL tyrosine phosphatases regulate Rho family

- GTPases to promote invasion and motility. *Cancer Res* 66:3153–3161
82. Liu LZ, He YZ, Dong PP, et al (2016) Protein tyrosine phosphatase PTP4A1 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma via the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 7:75210–75220
 83. Favia, de Bari, Bobba, Atlante (2019) An Intriguing Involvement of Mitochondria in Cystic Fibrosis. *J Clin Med* 8:1890
 84. Yu Y, Platoshyn O, Safrina O, Tsigelny I, Yuan JX-J, Keller SH (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functionality is dependent on coatomer protein I (COPI). *Biol Cell* 99:433–444
 85. Stornaiuolo M, Lotti L V., Borgese N, Torrisi MR, Mottola G, Martire G, Bonatti S (2003) KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and golgi complex. *Mol Biol Cell* 14:889–902
 86. Bräuer P, Parker JL, Gerondopoulos A, Zimmermann I, Seeger MA, Barr FA, Newstead S (2019) Structural basis for pH-dependent retrieval of ER proteins from the Golgi by the KDEL receptor. *Science* (80-) 363:1103–1107
 87. Hutt DM, Balch WE (2008) Rab1b Silencing Using Small Interfering RNA for Analysis of Disease-Specific Function. *Methods Enzymol* 438:1–10
 88. García IA, Martínez HE, Alvarez C (2011) Rab1b regulates COPI and COPII dynamics in mammalian cells. *Cell Logist* 1:159–163
 89. Melville DB, Studer S, Schekman R (2020) Small sequence variations between two mammalian paralogs of the small GTPase SAR1 underlie functional differences in coat protein complex II assembly. *J Biol Chem* 295:8401–8412
 90. Wang Z, Zhang H, Cheng Q (2020) PDIA4: The basic characteristics, functions and its potential connection with cancer. *Biomed Pharmacother.* <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109688>
 91. Jakobsson ME, Moen A, Bousset L, Egge-Jacobsen W, Kernstock S, Melki R, Falnes P (2013) Identification and characterization of a novel human methyltransferase modulating Hsp70 protein function through lysine methylation. *J Biol Chem* 288:27752–27763
 92. Xu Y, §1 C, Liu ¶, Clark JC, Whitsett JA (2006) Functional Genomic Responses to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and CFTR 508 in the Lung * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512072200>
 93. Mesquita Santos M (2012) Artigo de Revisão COMPLICAÇÕES PULMONARES DA FIBROSE QUÍSTICA. Universidade de Coimbra

94. Hurley M, Bhatt J, Smyth A (2011) Treatment massive haemoptysis in cystic fibrosis with tranexamic acid. *J R Soc Med Suppl* 104:S49
95. Schaller MD (2010) Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 123:1007–1013
96. Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR (2002) The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem* 277:15419–15425
97. Basso C, Vergani P, Nairn AC, Gadsby DC (2003) Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH 2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol* 122:333–348
98. Billet A, Jia Y, Jensen TJ, Hou Y-X, Chang X-B, Riordan JR, Hanrahan JW (2016) Potential sites of CFTR activation by tyrosine kinases. *Channels* 10:247–251
99. Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* (80-) 285:1028–1032
100. Sheppard D (2008) The role of integrins in pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev* 17:157–162
101. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts JW (2002) *Integrins, Molecular*. New York: Garland Science
102. Moraes BJRR de (2010) Study of CFTR delivery and stabilization at the plasma membrane Study of CFTR delivery and stabilization at the plasma membrane. Universidade de Lisboa
103. Lobo MG de OJF (2014) CFTR Trafficking and Membrane Anchoring – the role of cAMP signalling. Universidade de Lisboa
104. Edelman A (2014) Cytoskeleton and cftr. *Int J Biochem Cell Biol* 52:68–72
105. Cant N, Pollock N, Ford RC (2014) CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 52:15–25
106. Premchandrar A, Kupniewska A, Bonna A, et al (2017) New insights into interactions between the nucleotide-binding domain of CFTR and keratin 8. *Protein Sci* 26:343–354
107. Jagannath VA, Thaker V, Chang AB, Price AI (2020) Vitamin K supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008482.pub6>
108. Kobelska-Dubiel N, Klincewicz B, Cichy W (2014) Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol* 9:136–141
109. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É (2011) Factor XIII: A coagulation

factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev* 91:931–972

110. McPhail GL (2010) Coagulation Disorder as a Presentation of Cystic Fibrosis. *J Emerg Med* 38:320–322

7 Discussão Geral

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva com grande espectro de variabilidade clínica. Afeta células epiteliais de diversos órgãos principalmente os pulmões, mas também o intestino, pâncreas, fígado, sistema reprodutivo e glândulas sudoríparas exócrinas (Castellani e Assael 2017). Este distúrbio debilitante é baseado no funcionamento anormal da proteína CFTR causado por mais de 2.000 variantes já descritas, atingindo mais de 90.000 pessoas em todo o mundo (Lopes-Pacheco 2020). Esta proteína serve de canal do íon cloreto (Cl^-) e controla a secreção e absorção de água nos epitélios. Como consequência da ausência ou perda da função da proteína, ocorre maior produção de secreções viscosas, acarretando a obstrução pulmonar crônica, recorrentes infecções do trato gastrointestinal e respiratório, insuficiência pancreática, aumento da concentração de cloretos no suor e infertilidade masculina (Castellani e Assael 2017).

Abordagens multifatoriais aumentaram a sobrevida de pacientes com FC. Diagnóstico precoce, suporte nutricional, detecção do genótipo, intervenções pulmonares mais eficientes e monitoramento profissional multidisciplinar são algumas destas medidas. Mais recentemente, o desenvolvimento de medicamentos moduladores da CFTR está realizando avanços sobre as atuais abordagens em direção a uma nova era da medicina de precisão, visando a alteração básica da proteína CFTR de acordo com o genótipo do paciente (Lopes-Pacheco 2016; Marson *et al.* 2017; Corriveau *et al.* 2018; Skov *et al.* 2019). Nesta nova abordagem terapêutica, a informação molecular sobre as variantes que o paciente possui maximiza a precisão com que é categorizado e tratado (Perlman e Govindaraju 2016; Camerino *et al.* 2019). As terapias moduladoras da CFTR retificam os defeitos específicos de certas variantes do gene *CFTR* conforme o mecanismo molecular pelo qual a síntese, o tráfego ou a função da proteína está sendo afetada (Lopes-Pacheco 2020). Essas abordagens

incluem corretores, potencializadores, estabilizadores, amplificadores e agentes *read-through* (Clancy *et al.* 2019; Lopes-Pacheco 2020).

O recente surgimento de medicamentos de precisão variante-específicos evidencia o interesse da indústria farmacêutica nesta área. É possível conjecturarmos que venhamos a ter, cada vez mais, o desenvolvimento de medicamentos deste tipo ao longo dos próximos anos e décadas. A concorrência entre indústrias, e a posterior fabricação de medicamentos genéricos, tendem a tornar as tecnologias acessíveis a todos. Assim, é fundamental que o paciente tenha o conhecimento da variante causadora da sua doença. Esta valiosa informação o acompanhará ao longo de toda a sua vida, auxiliando no direcionamento mais adequado do tratamento.

Além disso, no caso de políticas de saúde pública, abrangendo grandes populações, torna-se importante que as metodologias aplicadas sejam custo-efetivas, ampliando ao máximo o número de variantes pesquisadas, mas mantendo o fator custo reduzido. Uma etapa importante do atual protocolo da triagem neonatal para FC, utilizado no país pelo Sistema Único de Saúde (SUS), consiste nos testes genéticos. No estado do Rio Grande do Sul (RS), são feitos em duas etapas sequenciais: nos casos em que não foi encontrada a variante mais frequente p.Phe508del em ambos os alelos, é realizado também um painel com 11 variantes mais prevalentes no estado (Rispoli *et al.* 2018). Mesmo após a triagem neonatal, a caracterização genotípica pode permanecer incompleta para uma parcela de indivíduos devido ao grande número de variantes já identificadas. Por isso, a ampliação do diagnóstico é de suma importância.

Com isto em vista, em um primeiro estudo objetivou-se padronizar um método de mini-sequenciamento para detectar 25 variantes, c.3454G>C, c.1645A>C (rs121908757 e rs121909005), c.1519_1521delATC, c.3140-26A>G, c.1682C>A, c.948delT, c.613C>T, c.1040G>A, c.1040G>C, c.3196C>T, c.1766+1G>A, c.11C>A, c.3276C>A, c.579+5G>A, c.579+1G>T, c.617T>G, c.2991G>C, c.1675G>A, c.3909C>G, c.3659delC, c.2052delA, c.1397C>A, c.3528delC, c.1680-1G>A no gene *CFTR* frequentes no RS e no Brasil, e assim ampliar a cobertura de detecção do SUS/RS das atuais 12 para 37 variantes. Essas variantes foram selecionadas por serem frequentemente identificadas em pacientes com FC no Brasil (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2016), com alto potencial de inclusão no sistema de saúde público brasileiro.

A validação do mini-sequenciamento foi realizada em 42 amostras de controle previamente genotipadas e foi altamente precisa ($Kappa = 1,00$; $p < 0,001$), sem quaisquer picos inespecíficos ou resultados ambíguos. A estratégia pode identificar 25 variantes na mesma reação e na mesma eletroforese capilar com alto poder de discriminação.

Uma análise comparativa foi realizada, entre a atual abordagem da rotina de triagem neonatal do estado do RS (variante p.Phe508del e painel de 11 variantes (Rispoli *et al.* 2018)) e a abordagem proposta considerando a adição do painel de 25 variantes desenvolvido. Uma coorte composta por 103 pacientes com FC foi utilizada para validação sequencial desses testes de triagem. Inicialmente, os pacientes foram testados para a variante p.Phe508del, resultando em 14,6% deles identificados como homozigotos para a variante p.Phe508del, 37,9% como heterozigotos com apenas um alelo detectado, e 47,5% corresponderam a diferentes variantes. Na sequência, foi utilizado o painel atual disponível nos serviços de diagnóstico, que pode detectar 11 variantes adicionais (Rispoli *et al.* 2018). Essa triagem, já somado às identificações de p.Phe508del, registrou 33% dos indivíduos com ambos os alelos

mutados identificados, 29,1% de indivíduos heterozigotos e 37,9% restantes sem alelos identificados. Por fim foi aplicado o painel desenvolvido com as 25 variantes complementares sugeridas para inclusão no protocolo molecular anterior. De nossa coorte testada, 52,43% tiveram variantes em ambos os alelos identificados, 18,5% identificados em heterozigose, e 29,1% restantes com variantes desconhecidas.

Nossa coorte incluiu pacientes para os quais, em trabalhos paralelos, foi utilizada a técnica de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) para identificar variantes em todo o gene *CFTR* (Salinas *et al.* 2016; Nunes *et al.* 2017), realizada por Mendelics® (<http://www.mendelics.com/>). Todos os resultados de genotipagem desse sequenciamento estavam disponíveis para nossa análise. Nesta pesquisa, 60% de todos os alelos mutados foram identificados e 10,77% apresentaram apenas uma variante. Considerando um total de 37 variantes triadas no painel proposto, foi possível identificar os dois alelos em 52,43% das amostras, percentual próximo ao resultado do NGS, e por meio de metodologia de baixo custo e análise de dados mais simples. Além disso, com base na análise da amostra, o VPP e o VPN foi de 100% (intervalo de confiança de 95% [IC]; 88,3 - 100) e de 99,1% (IC 95%; 98,7 - 99,5), respectivamente.

Em termos de frequência alélica, o painel proposto detectou 61,6% do total de alelos da coorte, ao passo que o NGS detectou 65,4% do total da amostra. Uma vez que, no estudo, a análise do NGS representa a detecção do exoma do *CFTR*, o painel proposto atingiu 94,1% deste total detectável.

De acordo com o "Consenso sobre o Uso e Interpretação da Análise de Mutação de Fibrose Cística na Prática Clínica", a heterogeneidade de variantes no gene *CFTR* torna desafiador o objetivo de se obter uma taxa de detecção superior a 95% de todas as variantes

em painéis de análise genética, usando técnicas genéticas moleculares atuais (Castellani *et al.* 2008). Originalmente, de acordo com Relatório do Registro Brasileiro de FC (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2015) o painel proposto atingia uma taxa de cobertura de 98,57% das variantes listadas. Com a nova edição (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2016), em novembro de 2018, e maior número de variantes conhecidas, a taxa de detecção do painel ficou em 93,0%.

No estado do RS, a abordagem composta do painel proposto somado ao protocolo atual, é capaz de identificar 311 alelos de todos os 347 alelos conhecidos no estado (Rispoli *et al.* 2020), ou seja, uma cobertura de 90%. Destaca-se que embora tenha sido personalizado visando a população do estado do RS, a maior cobertura em nível brasileiro se deve às contribuições individuais de determinadas variantes contempladas, que são mais significativas na população brasileira e menores na população do RS. Destacamos que todos os alelos mutados brasileiros foram analisados anteriormente a partir de NGS e *kits* de diagnóstico comerciais. Nesse sentido, o protocolo atualizado que combina a detecção de p.Phe508del mais 11 variantes e 25 novas variantes pode ser aplicado para diagnosticar alelos mutados com custo-benefício, tanto regionalmente quanto em nível nacional.

Sugerimos que a técnica de mini-sequenciamento para o painel de 37 variantes pode ser um método alternativo para inclusão nas rotinas de triagem neonatal, após dosagem de IRT e teste do suor, em países emergentes com recursos limitados. A técnica também oferece triagem molecular de alto rendimento com menor custo, permitindo a análise simultânea de vários polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* - SNPs) em um curto período (Latini *et al.* 2014). Outra grande vantagem do mini-sequenciamento é a possibilidade de customizar o grupo de SNPs alvo, sendo possível adaptar os painéis de acordo com a frequência das variantes em cada país e até mesmo em cada estado. Este é um

fator muito importante considerando populações com grande heterogeneidade étnica como o Brasil, onde as frequências alélicas podem variar entre as regiões do país (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2016). Além disso, a alta frequência alélica da variante p.Phe508del (45,97% observada no Brasil (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2016) e 49,19% observada no RS (Rispoli *et al.* 2018)) e menores custos de reagentes, mostra que o teste molecular nesta variante deve ser o primeiro conduzido, seguido pela análise molecular de outras variantes (painel de 11 variantes mais painel de 25 variantes) combinadas em uma análise de 36 variantes. Esta abordagem de testes moleculares em etapas sucessivas, cuja implementação depende dos resultados de cada estágio anterior, também foi recomendada em estudo recente (Bienvenu *et al.* 2020). Essas características ajudariam a incorporar a estratégia molecular proposta neste trabalho ao sistema de saúde pública brasileira já existente.

Apesar de todas as vantagens que esta técnica tem, ela falha em identificar grandes deleções, outros tipos de variantes como inserções e algumas variantes sobrepostas. Outra limitação é que não é possível incluir todas as variantes conhecidas descritas no mesmo painel de mini-sequenciamento.

Atualmente, plataformas de teste aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) estão disponíveis comercialmente para testes moleculares do gene *CFTR*. De acordo com o *American College of Medical Genetics*, um painel molecular deve incluir um mínimo de 23 variantes. Além disso, qualquer plataforma de teste deve considerar a composição étnica da população de pacientes que será examinada (Castellani *et al.* 2008). Em nosso trabalho, o painel molecular proposto atende a esses requisitos internacionais e está adaptado à realidade econômica do Brasil; por esses motivos, sua aplicabilidade é real.

Um segundo estudo realizado, consistiu na identificação e análise por biologia estrutural computacional de uma nova variante, S511Lfs*2, no gene *CFTR*, até então não descrita na literatura em pacientes com FC.

O conhecimento de novas variantes, sua classificação e mecanismos moleculares, são essenciais para entender a patogenicidade da FC e para a descoberta de medicamentos capazes de corrigir proteínas defeituosas (De Boeck e Amaral 2016; Zainal Abidin *et al.* 2017). Modelos *in silico* são ferramentas úteis para prever o grau de patogenicidade de variantes incertas, auxiliando a elucidar a alteração da proteína a nível estrutural. O estudo de novas variantes é mais uma forma importante de contribuição na melhoria dos tratamentos atuais e futuros da doença.

No estudo realizado, verificou-se a sequência de aminoácidos, a estrutura da proteína e previu-se a patogenicidade da nova variante. A paciente era uma mulher genotipada com uma variante já descrita como causadora de FC (c.1000C>T; R334W), e a nova variante (S511Lfs*2).

Estudos demonstraram que uma deleção de resíduo único na região 491-525 provoca uma série de anormalidades na função CFTR (Chen *et al.* 2019). Embora tenham visto que, especificamente, as deleções dos aminoácidos V510 e S511 não causaram problemas no processamento da proteína CFTR, a nova variante S511Lfs*2 é causada pela deleção de dois nucleotídeos T em códons diferentes.

Essa modificação, de tipo *frameshift*, causa a perda do aminoácido S511 e altera a fase de leitura, modificando assim todas as posições subsequentes dentro da região crítica 511-525, além de também causar a formação de um códon de terminação prematura (*premature termination codon* - PTC). O PTC leva à produção da proteína CFTR truncada e

não funcional, o que pode ativar um mecanismo pós-transcricional denominado decaimento de RNAm mediado por *nonsense* (*nonsense mediated decay* - NMD), que detecta e degrada o transcrito mutado (Lejeune 2017; Zainal Abidin *et al.* 2017; Clarke *et al.* 2018).

A possível ativação do NMD, associada a valores de predição de patogenicidade, dados clínicos do paciente e produção de proteína defeituosa, permitiram classificar esta variante como uma classe IB (De Boeck e Amaral 2016; Marson *et al.* 2016). Contudo, independentemente da ativação do NMD, a estrutura da proteína seria fortemente afetada devido à ausência da proteína CFTR funcional de comprimento total.

A análise estrutural da proteína CFTR mostrou que a nova variante S511Lfs*2 está no domínio NBD1, perto da variante p.Phe508del. A análise *in silico* nesta região mostrou um alto grau de conservação. Assim, quaisquer alterações neste domínio têm um impacto deletério na proteína por afetar regiões essenciais, como o domínio de ligação de ATP, que é essencial para permitir o estado aberto/fechado do canal, e o domínio de ligação de PDZ, que desempenha um papel fundamental na ancoragem de proteínas na membrana celular (Guggino 2004).

Além disso, esta nova variante eliminaria potencialmente o domínio R devido à proximidade dos domínios perdidos da proteína. Esta região é essencial para a funcionalidade da proteína uma vez que o canal é ativado pela fosforilação do domínio R. Infelizmente, não foi possível observar a consequência da variante neste domínio devido à ausência de estrutura por crio-microscopia eletrônica (crio-ME) (Guggino 2004; Liu *et al.* 2017; Lejeune 2017; Zainal Abidin *et al.* 2017; Clarke *et al.* 2018; Chen *et al.* 2019).

No caso estudado, o aparecimento tardio dos sintomas poderia ser explicado pelo fato da nova variante S511Lfs*2 estar em heterozigose composta com a variante c.1000C> T

(legado: R334W), quarta variante patogênica mais frequente entre os pacientes brasileiros com FC e que leva a um fenótipo leve (classe IV) (Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística 2016; De Boeck e Amaral 2016). Esta variante seria responsável por conferir atividade residual ao canal CFTR (Kristidis *et al.* 1992; Sheppard *et al.* 1993), apesar da alta patogenicidade da variante S511Lfs*2, associada a nenhuma síntese de proteína CFTR.

Uma terceira contribuição deste trabalho, visa auxiliar no entendimento da implicação total das variantes do CFTR nos diversos órgãos, uma vez que a FC é uma doença multissistêmica e com ampla heterogeneidade genética e clínica (Castellani e Assael 2017). A compreensão e estudo do perfil da expressão gênica da doença nos diferentes tecidos, auxilia no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas variante-específicas e tecido-específicas. Devido à complexidade inerente aos sistemas biológicos, a caracterização completa de doenças ainda é um desafio. A biologia de sistemas é uma ferramenta oportuna para lidar com esse problema (Somvanshi e Venkatesh 2014), pois permite ter uma visão sistêmica de todos os processos e vias impactadas por uma determinada condição.

Na literatura, os efeitos da variante p.Phe508del na fisiologia de cada tecido ainda não foram totalmente descritos. Embora os pacientes com FC sofram mais comumente de problemas respiratórios, a implicação total das variantes no gene *CFTR* nos demais sistemas, tais como no trato gastrointestinal, ainda requer melhor compreensão. Assim, através da biologia de sistemas objetivou-se avaliar *in silico* o perfil de expressão gênica em tecido brônquicos e retal de indivíduos com FC (p.Phe508del homozigotos), visando um melhor entendimento do impacto da doença na fisiologia destes dois tecidos.

Para explorar os principais processos biológicos alterados em pacientes com FC, foram coletados dois conjuntos diferentes de dados de *microarray* no repositório *Array*

Express, correspondendo aos epitélios retal e brônquico. Ambos os conjuntos de dados são compostos por amostras de pacientes com FC homozigotos para p.Phe508del, que foram comparados com o tecido correspondente de indivíduos sem FC, obtendo-se os genes diferencialmente expressos (DEGs). Estes DEGS de cada conjunto de dados foram usados como entrada para a projeção das redes de interação proteína-proteína (PPI) para cada tecido. Visando avaliar a relevância topológica da rede, uma análise de centralidade foi realizada, onde foram considerados os parâmetros de grau de centralidade e intermediação do nó, identificando nós com papel essencial regulador na célula, como *hubs* e *hubs-bottleneck*. *Clusters* com pontuação acima de 3 foram selecionados para posterior análise da ontologia gênica (*Gene Ontology* - GO).

Os resultados encontrados neste estudo de biologia de sistemas, tanto para os tecidos brônquicos quanto retais, mostraram uma concordância entre as ontologias gênicas representadas nos principais *clusters* de cada tecido e os fenótipos observados em pacientes com FC. Em ambos os epitélios foram encontradas superexpressão de ontologias relacionadas a processos pró-inflamatórios, resposta imunológica e *stress* oxidativo. Estes, são fortemente caracterizados por infecção bacteriana, infiltrações de neutrófilos no pulmão e níveis elevados de citocinas, típicos do quadro de fibrose cística (Justicia *et al.* 2015; Cribbs e Beck 2017; Castellani e Assael 2017; Savant e McColley 2017). Os principais DEGs relacionados, no epitélio do brônquio, foram *S100A12*, *S100A8*, *S100A9*, *CXCR4*, *IL1B*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF3*, *OSM*, *SOD2*, *GSTA1*, *GSTA2* e *GSTA3*. No epitélio do reto, *SERPINA1*, *ATP6V0C*, *PLAG2G2A*, *LCN2*, *STAT3* e *YWHAZ* foram os DEGs mais destacados para estas ontologias. As manifestações clínicas da FC no trato GI, como inflamação e obstrução, estão associadas à desregulação de processos críticos para a homeostase do tecido, inter-relacionados ao *CFTR* (Raia *et al.* 2000; Manor *et al.* 2016).

Estes incluem a composição da microflora intestinal, barreira essencial que protege a camada de células epiteliais e garante a homeostase, e resposta imune (Reed e Shores 2020).

Além disto, *LCN2*, *STAT3* e *YWHAZ* estão relacionados também à processos de diferenciação celular e câncer, situando-se no mesmo *cluster*, juntamente com *PTP4A1*. Na literatura, a deficiência de CFTR foi associada a riscos oncológicos elevados. Um estudo prospectivo de 20 anos em mais de 40.000 pacientes no Registro de Pacientes dos EUA resultou em um diagnóstico de câncer de intestino em 31 casos, uma frequência significativamente elevada, seja no cólon (26 observados contra 4,2 esperados) ou intestino delgado (5 observados contra 0,4 esperado) (Castellani e Assael 2017). Taxas aumentadas de câncer também foram relatadas no trato biliar, no esôfago e no estômago (Maisonneuve *et al.* 2013).

Em ambos os epitélios, também foram encontrados, nos *clusters* selecionados, DEGs relacionados à localização da proteína na membrana e homeostase do tecido, correlacionados à má conformação da proteína CFTR. No epitélio brônquico tem destaque a superexpressão do gene *hub-bottleneck* *PLAU* e a subexpressão de *PTK2*, *ITGA2* e *ITGB5*. Os resultados corroboram com o fato de que indivíduos com FC e epitélio pulmonar lesado apresentam menor estagnação hemorrágica, principalmente no contexto de infecção respiratória (Hurley *et al.* 2011; Santos 2012). No epitélio retal, *ACTB*, *KRT8* e *F13A1* tiveram os maiores valores de expressão diferencial, estando a subexpressão de *F13A1* relacionada à reduzida estabilização de coágulo de fibrina, levando a sangramentos (Kobelska-Dubiel *et al.* 2014; Jagannath *et al.* 2020), e a superexpressão do genes HB *ACTB* e *KRT8* também codificando proteínas relacionadas a membrana celular em função do defeito na proteína CFTR (Moraes 2010; Lobo 2014; Cant *et al.* 2014; Premchandrar *et al.* 2017).

No epitélio retal, foram observados, adicionalmente, um conjunto de DEGS superexpressos, no mesmo *cluster*, relacionados à regulação do transporte mediado por vesículas: *COPG1*, *KDEL1*, *KDEL2*, *KDEL3*, *RAB1B* e *SAR1*. A degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático e ativação dessas ontologias é induzida pelo erro no processamento da CFTR causado pela variante p.Phe508del (Hybiske *et al.* 2007).

As ontologias observadas e descritas em detalhe no artigo do terceiro estudo, corroboram com pesquisas de outros autores, tanto para o epitélio retal (Anderson *et al.* 2019; Scott *et al.* 2020), como para o brônquico (Castellani e Assael 2017), e conduzem, pelos mecanismos descritos, aos fenótipos típicos observados em indivíduos portadores da variante p.Phe508del. O estudo de biologia de sistemas realizado coloca em evidência importantes DEGs de cada epitélio e procura descrever e relacionar os mecanismos de atuação molecular, descritos na literatura, com as características fenotípicas observadas.

O estudo sugere ainda que apesar de certas semelhanças em diversas ontologias, cada epitélio possui suas próprias diferenças no contexto da doença. Isso pode ser devido à presença da variante p.Phe508del, ou fatores epigenéticos e ambientais, como por exemplo o uso acentuado de antibióticos pelos pacientes com FC. Esses fatos devem ser considerados na previsão do diagnóstico e abordagens terapêuticas de precisão para cada indivíduo com FC.

Os 3 estudos realizados visaram contribuir para a melhoria da condição de vida dos pacientes afetados por esta debilitante doença. O diagnóstico molecular mais preciso e custo-efetivo para implementação no serviço de saúde público contribuí para que os pacientes possam usufruir de um direcionamento mais adequado do tratamento e conseqüente melhoria na qualidade de vida. Da mesma forma, o melhor entendimento das bases genéticas e

mecanismos moleculares da doença auxilia no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, variante e tecido-específicas, contribuindo, assim, com o desenvolvimento da medicina de precisão.

8 Conclusões

A partir dos resultados pode-se concluir que:

- O fluxo de pesquisa molecular proposto para a triagem neonatal (no sistema público de saúde) mostrou-se eficiente para a detecção de variantes no gene *CFTR* tanto no estado do RS como no Brasil.
- A técnica de mini-sequenciamento padronizada apresentou elevados índices de cobertura alélica de 90% para o RS e 93% para o Brasil. Esses dados mostram que a inclusão desses painéis na pesquisa molecular alcança resultados semelhantes aos resultados obtidos pelo NGS, com metodologia e análise menos complexas, menor custo, possibilitando sua inserção nas políticas públicas de saúde existentes.
- A investigação e estudo por biologia estrutural computacional da nova variante S511Lfs*2, do tipo *frameshift*, confirmou que se trata de uma variante altamente patogênica associada a nenhuma síntese da proteína CFTR.
- O estudo por biologia de sistemas revelou que ontologias de processos pró-inflamatórios, resposta imunológica e *stress* oxidativo, são comuns no perfil de expressão gênica de ambos os epitélios brônquico e retal e conduzem ao fenótipo típico observado. Ontologias específicas relacionadas à diferenciação celular e regulação do transporte mediado por vesículas foram observadas no epitélio do reto.

Todos os 3 estudos realizados somam esforços de contribuição para o correto diagnóstico genético, assim como para o desenvolvimento da medicina da nova era de precisão.

9 Perspectivas

- Avaliar por biologia estrutural computacional o efeito de outras variantes de significado incerto (do tipo *missense*) encontradas em pacientes com sinais clínicos típicos de fibrose cística.
- Realizar uma análise de coexpressão dos tecidos analisados por biologia de sistemas;
- Analisar o perfil da expressão gênica em tecidos adicionais de pacientes com FC;

10 Referências Bibliográficas

- Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, et al (2010) Effect of VX-770 in Persons with Cystic Fibrosis and the G551D- CFTR Mutation . *N Engl J Med* 363:1991–2003.
- Andersen DH (1938) Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 56:344.
- Andersen DH, Hodges RG (1946) Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72:62–80.
- Anderson KJ, Cormier RT, Scott PM (2019) Role of ion channels in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 25:5732–5772.
- Athanazio RA, Silva Filho LVRF da, Vergara AA, et al (2017) Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 43:219–245.
- Balfour-Lynn IM, King JA (2020) CFTR modulator therapies – Effect on life expectancy in people with cystic fibrosis. *Pediatr Respir Rev.* (no prelo)
- Barbosa AP, Sztajnbok J (1999) Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr S223: 75:223–233.*
- Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, et al (2020) The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir. Med.* 8:65–124.
- Bieger AM, Marson FADL, Bertuzzo CS (2012) Prevalence of DeltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. *J Pediatr* 88:531–534.
- Biennu T, Lopez M, Girodon E (2020) Molecular diagnosis and genetic counseling of cystic fibrosis and related disorders: New challenges. *Genes* 11:1–16.
- Billings JL, Dunitz JM, McAllister S, et al (2014) Early colon screening of adult patients with cystic fibrosis reveals high incidence of adenomatous colon polyps. *J. Clin. Gastroenterol.* 48:e85–e88.
- Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* 19:575–606.
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al (2011) Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 10 Suppl2: S86-S102.

- Bonadia LC, De Lima Marson FA, Ribeiro JD, et al (2014) CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene* 540:183–190.
- Brennan AL, Geddes DM (2002) Cystic fibrosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15:175–182.
- Burney TJ, Davies JC (2012) Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. *Appl. Clin. Genet.* 5:29–36.
- Camerino DC, Lopes-Pacheco M, Pedemonte N, Kicic A (2019) Editorial: Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 10:1440.
- Cant N, Pollock N, Ford RC (2014) CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 52:15–25.
- Carling RC, Di Sant’Agnese PA, Perera GA, Andersen DH (1953) Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. *Am J Med Sci* 225:67–70.
- Castellani C, Assael BM (2017) Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci* 74:129–140.
- Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, et al (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice NIH Public Access. *J Cyst Fibros* 7:179–196.
- Castellani C, Duff AJA, Bell SC, et al (2018) ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J. Cyst. Fibros.* 17:153–178.
- Castellani C, Massie J (2010) Emerging issues in cystic fibrosis newborn screening. *Curr Opin Pulm Med* 16:166.
- Chamayou S, Sicali M, Lombardo D, et al (2020) The true panel of cystic fibrosis mutations in the Sicilian population. *BMC Med Genet* 21(1):89.
- Chan H, Ruan Y, He Q (2009) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol* 2187–2195.
- Chen X, Zhu S, Zhenin M, et al (2019) A defective flexible loop contributes to the processing and gating defects of the predominant cystic fibrosis-causing mutation. *Faseb J* 33:5126–5142.
- Chmiel J, Drumm M, Konstan M, et al (1999) Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. *Pediatrics* 823–6.
- Cipolli M, Castellani C, Wilcken B, et al (2007) Pancreatic phenotype in infants with cystic fibrosis identified by mutation screening. *Arch Dis Child* 92:842–846.

- Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, et al (2019) CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J. Cyst. Fibros.* 18:22–34.
- Clarke LA, Awatade NT, Felício VM, et al (2018) The effect of premature termination codon mutations on CFTR mRNA abundance in human nasal epithelium and intestinal organoids: a basis for read-through therapies in cystic fibrosis. *Hum Mutat* 40:humu.23692.
- Collins FS, Riordan JR, Tsui LC (1990) The cystic fibrosis gene: Isolation and significance. *Hosp. Pract.* 25:47–57.
- Corriveau S, Sykes J, Stephenson AL (2018) Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology. *Curr Opin Pulm Med* 24:1.
- Corvol H, Blackman SM, Boëlle PY, et al (2015) Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun* 6:23.
- Cribbs SK, Beck JM (2017) Microbiome in the pathogenesis of cystic fibrosis and lung transplant-related disease. *Transl. Res.* 179:84–96
- Cutting GR (2010) Modifier genes in Mendelian disorders: The example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1214:57–69.
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16:45–56.
- Daftary A, Acton J, Heubi J, Amin R (2006) Fecal elastase-1: Utility in pancreatic function in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 5:71–76.
- De Boeck K (2020) Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *J. Paediatr.* 109:893–899.
- De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 4:662–674.
- De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L (2017) The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med* 46:e97–e108.
- Di Paolo M, Di Gaeta A, Indino EL, et al (2020) Pancreatic cystosis in cystic fibrosis: Sometimes a bike ride can help you decide. *Respir Med Case Reports* 29:1010-18.
- Di Sant’Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953a) Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med* 15:777–784.

- Di Sant’Agnese PEA, Andersen DH (1946) Celiac syndrome; chemotherapy in infections of the respiratory tract associated with cystic fibrosis of the pancreas; observations with penicillin and drugs of the sulfonamide group, with special reference to penicillin aerosol. *Am J Dis Child* 72:17–61.
- Di Sant’Agnese PEA, Darling RC, Perara GA, Shea E (1953b) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Dis Child* 86:618–619.
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, et al (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62:1227–33.
- Elborn J, Ingenito E, McKone E, et al (2017) Tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* 377:.
- Elborn JS (2016) Cystic fibrosis. *Lancet* 388:2519–2531.
- Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C (1936) Das Coeliakie-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 86:753–756.
- Farber S, Shwachman H, Maddock CL (1943) Pancreatic function and disease in early life. I. Pancreatic enzyme activity and the celiac syndrome 1. *J Clin Invest* 22:827–838.
- Faria E, Faria I, Alvarez A, et al (2014) Association between alpha 1 antitrypsin deficiency and cystic fibrosis severity. *Pediatrics* 81:485–90.
- Farrell PM, White TB, Ren CL, et al (2017) Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 181:S4-S15.e1.
- Flotte TR, Laube BL (2001) Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest* 120:124S-131S.
- Fraser-Pitt D, O’Neil D (2015) Cystic fibrosis - A multiorgan protein misfolding disease. *Futur Sci OA* 1(2):25-36.
- Freeman AJ, Ooi CY (2017) Pancreatitis and pancreatic cystosis in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros* 16:S79–S86.
- Gadsby D, Vergani P, Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nat rev* 440:477–483.
- Gallati S (2014) Disease-modifying genes and monogenic disorders: Experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 7:133–146.
- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (2017) The Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry. *Rebrafc* <http://portalgbefc.org.br/>

- Geftic SG, Heymann H, Adair FW (1979) Fourteen year survival of *Pseudomonas cepacia* in a salts solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl Environ Microbiol* 37:505–510.
- Gesteira R (1949) Fibrose cística no pâncreas-incidência no Brasil. *Bol Inst Pueric* 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* 545–99.
- Govan JRW, Doherty CJ, Nelson JW, et al (1993) Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* 342:15–19.
- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (2016) The Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry. Patient Registry. *Rebrafc* <http://portalgbefc.org.br/>
- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (2015) The Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry. *Rebrafc* <http://portalgbefc.org.br/>
- Guggino W, Stanton B (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 426–436.
- Guggino WB (2004) The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc* 1:28–32.
- Hadjiliadis D, Khoruts A, Zauber AG, et al (2018) Cystic Fibrosis Colorectal Cancer Screening Consensus Recommendations. *Gastroenterology* 154:736-745.e14.
- Hoiby N (1977) Antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in serum from normal persons and patients colonized with mucoid or non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: Results obtained by crossed immunoelectrophoresis. *Acta Pathol Microbiol Scand - Sect C Immunol* 85:142–148.
- Hurley M, Bhatt J, Smyth A (2011) Treatment massive haemoptysis in cystic fibrosis with tranexamic acid. *J R Soc Med Suppl* 104:S49.
- Hwang T-C, Sheppard DN (2009) Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol* 587:2151–61.
- Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C, et al (2007) Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and $\Delta F508$ CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 293:.
- ICFMA International Cystic Fibrosis / Mucoviscidosis / Association | UIA Yearbook Profile | Union of International Associations. <https://uia.org/s/or/en/1100049199>. Acessado em 18 outubro de 2020.

- Isles A, Maclusky I, Corey M, et al (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: An emerging problem. *J Pediatr* 104:206–210.
- Jagannath VA, Thaker V, Chang AB, Price AI (2020) Vitamin K supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6:CD008482.
- Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA (2011) Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 300: G82–G98.
- Justicia JL, Solé A, Quintana-Gallego E, et al (2015) Management of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis: Still an unmet medical need in clinical practice. *Expert Rev. Respir. Med.* 9:183–194.
- Keating D, Marigowda G, Burr L, et al (2018) VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med* 379:1612–1620.
- Kerem B-S (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Trends Genet* 5:363.
- Kerem E, Webb AK (2014) European cystic fibrosis society standards of care: A road map to improve CF outcome. *J. Cyst. Fibros.* 13:357–358.
- Kessler WR, Andersen DH (1951) Heat prostration in fibrocystic disease of the pancreas and other conditions. *Pediatrics* 8:648–656.
- 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* 12813–12819.
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R (1981) Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305:1489–95.
- Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N, et al (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318:380–382.
- Kobelska-Dubiel N, Klincewicz B, Cichy W (2014) Liver disease in cystic fibrosis. *Prz. Gastroenterol.* 9:136–141.
- Kraemer R, Latzin P, Pramana I, et al (2009) Long-term gas exchange characteristics as markers of deterioration in patients with cystic fibrosis. *Respir Res* 10:106

- Kristidis P, Bozon D, Corey J, Danuta Markiewicz M, et al (1992) Genetic Determination of Exocrine Pancreatic Function in Cystic Fibrosis. *Am J Hum Genet* 50:1178–1184.
- Landsteiner K (1905) Darmverschluss durch eingedicktes meconium. *Pankreatites e Zentrabl allg Path* 6:903
- Latini FRM, Gazito D, Arnoni CP, et al (2014) A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. *Blood Transfus* 12 Suppl 1:s256-63.
- Lawson D (1972) Cystic fibrosis-Assessing the effects of treatment. *Arch. Dis.Child.*47:1-4
- Lejeune F (2017) Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep* 50:175–185.
- Lima Marson F, Bertuzzo C, Ribeiro J (2014) Personalized Drug Therapy in Cystic Fibrosis: From Fiction to Reality. *Curr Drug Targets* 16:1007–1017.
- Linsdell P (2017) Architecture and functional properties of the CFTR channel pore. *Cell. Mol. Life Sci.* 74:67–83.
- Liu F, Zhang Z, Csanády L, et al (2017) Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell* 169:85-95.e8.
- Lobo MG de OJF (2014) CFTR Trafficking and Membrane Anchoring – the role of cAMP signalling. *Tese de Doutorado*. Universidade de Lisboa.
- Lopes-Pacheco M (2020) CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front. Pharmacol.* 10
- Lopes-Pacheco M (2016) CFTR modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 7:275
- Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T (2012) Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 45:1132–1144.
- Lucarelli M, Pierandrei S, Bruno SM, Strom R (2012) The Genetics of CFTR : Genotype – Phenotype Relationship , Diagnostic Challenge and Therapeutic Implications. *Cyst Fibros – Renewed Hopes Through Res InTech*:91–122.
- MacDonald K, McKenzie K, Zeitlin P (2007) Cystic fibrosis transmembrane regulator protein mutations: “class” opportunity for novel drug innovation. *Pediatr drugs* 1–10

- Maisonneuve P, Marshall BC, Knapp EA, Lowenfels AB (2013) Cancer risk in cystic fibrosis: A 20-year nationwide study from the United States. *J Natl Cancer Inst* 105:122–129.
- Manor O, Levy R, Pope CE, et al (2016) Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. *Sci Rep* 6: 22493.
- Mantle DJ, Norman AP (1966) Life-table for Cystic Fibrosis. *Br Med J* 2:1238–1241.
- Marson FAL (2018) Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 24:296–308.
- Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD (2017) Personalized or precision medicine? The example of cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* 8:390
- Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD (2016) Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med* 4:e37–e38.
- Massie J, Clements B (2005) Diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening: The australasian experience twenty years and five million babies later. *Pediatr Pulmonol* 39(5):440-6.
- McCarthy VA, Harris A (2005) The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr. Pulmonol.* 40:1–8.
- Mishra A, Greaves R, Massie J (2005) The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. *Clin Biochem Rev* 6: 135-153.
- Moffet HL, Williams T (1967) Bacteria Recovered from Distilled Water and Inhalation Therapy Equipment. *Am J Dis Child* 114:7–12.
- Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, et al (2013) Cystic fibrosis pulmonary guidelines: Chronic medications for maintenance of lung health. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187:680–689.
- Moraes BJRR de (2010) Study of CFTR delivery and stabilization at the plasma membrane. Study of CFTR delivery and stabilization at the plasma membrane. Tese de doutorado. *Universidade de Lisboa.*
- Morrell MR, Pilewski JM (2016) Lung Transplantation for Cystic Fibrosis. *Clin. Chest Med.* 37:127–138.

- Niccum DE, Billings JL, Dunitz JM, Khoruts A (2016) Colonoscopic screening shows increased early incidence and progression of adenomas in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 15(4): 548-553.
- Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, et al (2008) Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *Clin Biochem Rev* 153–177.
- Nunes LM, Ribeiro R, Niewiadonski VDT, et al (2017) A new insight into CFTR allele frequency in Brazil through next generation sequencing. *Pediatr Pulmonol* 52:1300–
- Pereira SV-N, Ribeiro JD, Ribeiro AF, et al (2019) Novel, rare and common pathogenic variants in the CFTR gene screened by high-throughput sequencing technology and predicted by in silico tools. *Sci Rep* 9:6234.
- Perlman RL, Govindaraju DR (2016) Archibald E. Garrod: the father of precision medicine. *Genet in Med* 18(11) 1088-1089.
- Premchandar A, Kupniewska A, Bonna A, et al (2017) New insights into interactions between the nucleotide-binding domain of CFTR and keratin 8. *Protein Sci* 26:343–354.
- Quinton PM (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301:421–2
- Quinton PM (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: A historical perspective. *Physiol. Rev.* 79(1):S3-S22.
- 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* 506–513.
- Raia V, Maiuri L, De Ritis G, et al (2000) Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* 47:344–350.
- Ramos KJ, Smith PJ, McKone EF, et al (2019) Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. *J. Cyst. Fibros.* 18:321–333.
- Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, et al (2015) Cystic fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1:15010
- Reed A, Shores D (2020) Gastrointestinal manifestations of cystic brosis: A primer for pediatricians. *Contemp Pediatr* 37:12–16.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of

Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–24.

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–73.
- Rispoli T, Martins de Castro S, Grandi T, et al (2018) A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System. *J Pediatr* 199:272-277.e3.
- Rispoli T, Rodrigues GM, de Castro SM, et al (2020) Cystic Fibrosis: A Simple and Customized Strategy for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns. *Mol Diagnosis Ther* 24:3.
- Robinson CA, Hofer M, Benden C, Schmid C (2019) Evaluation of bone disease in patients with cystic fibrosis and end-stage lung disease. *J Bras Pneumol* 45(1): e20170280
- Robinson MJ, Norman AP (1975) Life tables for cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 50:962–965.
- Rogan M, Stoltz D, Hornick D (2011) Cystic fibrosis transmembrane regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* 1480–1490.
- Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B-S, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* (80) 1059–65.
- Rosenfeld M, Sontag MK, Ren CL (2016) Cystic Fibrosis Diagnosis and Newborn Screening. *Pediatr. Clin. North Am.* 63:599–615.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ (2005) Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 352:1992–2001.
- Rowland M, Gallagher C, Gallagher CG, et al (2015) Outcome in patients with cystic fibrosis liver disease. *J Cyst Fibros* 14:120–126.
- Rutter WC, Burgess DR, Burgess DS (2017) Increasing Incidence of Multidrug Resistance Among Cystic Fibrosis Respiratory Bacterial Isolates. *Microb Drug Resist* 23:51–55.
- Sakiani S, Kleiner DE, Heller T, Koh C (2019) Hepatic Manifestations of Cystic Fibrosis. *Clin. Liver Dis.* 23:263–277
- Salinas DB, Sosnay PR, Azen C, et al (2016) Benign and Deleterious Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutations Identified by Sequencing in Positive Cystic Fibrosis Newborn Screen Children from California. *PLoS One* 11:e0155624.

- Samson C, Tamalet A, Thien HV, et al (2016) Long-term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Respir Med* 117:1–6.
- Santos MM (2012) Complicações pulmonares da fibrose quística. Universidade de Coimbra
- Sathe MN, Freeman AJ (2016) Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatobiliary Manifestations of Cystic Fibrosis. *Pediatr. Clin. North Am.* 63:679–698.
- Savant AP, McColley SA (2017) Cystic fibrosis year in review 2016. *Pediatr Pulmonol* 52:1092–1102.
- Scotet V, L’hostis C, Férec C (2020) The changing epidemiology of cystic fibrosis: Incidence, survival and impact of the CFTR gene discovery. *Genes (Basel)* 11:589.
- Scott P, Anderson K, Singhanian M, Cormier R (2020) Cystic Fibrosis, CFTR, and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 21:2891.
- Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabédian M, et al (2011) European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros* 10(2): S16-S23.
- Servidoni MF, Gomez CCS, Marson FAL, et al (2017) Sweat test and cystic fibrosis: overview of test performance at public and private centers in the state of São Paulo, Brazil. *J Bras Pneumol* 43:121–128.
- Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, et al (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62:650–651.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, et al (1993) Mutations in CFTR associated with mild-disease-form CI- channels with altered pore properties. *Nature* 362:160–164.
- Shwachman H, Lebenthal E, Khaw KT (1975) Recurrent acute pancreatitis in patients with cystic fibrosis with normal pancreatic enzymes. *Pediatrics* 55:86–95.
- Simmonds EJ, Conway SP, Ghoneim ATM, et al (1990) Pseudomonas cepacia: A new pathogen in patients with cystic fibrosis referred to a large centre in the United Kingdom. *Arch Dis Child* 65:874–877.
- Skov M, Hansen CR, Pressler T (2019) Cystic fibrosis – an example of personalized and precision medicine. *APMIS* 127:352–360.
- Sokol RJ, Durie PR (1999) Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28:1

- Somvanshi PR, Venkatesh K V. (2014) A conceptual review on systems biology in health and diseases: From biological networks to modern therapeutics. *Syst Synth Biol* 8:99–116.
- Szaff M, Hoiby N, Flensburg EW (1983) Frequent antibiotic therapy improves survival of cystic fibrosis patients with chronic pseudomonas aeruginosa infection. *Acta Paediatrica* 72:651–657.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, et al (1985) Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230:1054–1057.
- Tsui LC, Dorfman R (2013) The cystic fibrosis gene: A molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(2): a009472.
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, et al (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 27:424–433.
- Wagener JS, Millar SJ, Mayer-Hamblett N, et al (2018) Lung function decline is delayed but not decreased in patients with cystic fibrosis and the R117H gene mutation. *J Cyst Fibros* 17:503–510.
- Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, et al (1985) Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318:384–385.
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al (2015) Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 373:220–231.
- Wang Y, Wrennall JA, Cai Z, et al (2014) Understanding how cystic fibrosis mutations disrupt CFTR function: From single molecules to animal models. *Int J Biochem Cell Biol* 52:47–57.
- Weiler CA, Drumm ML (2013) Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Front. Pharmacol* 4:1-19.
- Welsh M, Ramsey B, Accurso F, Cutting G (2001) The molecular and metabolic basis of inherited disease. *McGraw Hill* 1:5121-88.
- Welsh M, Smith A (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1251–4.
- Wilschanski M, Novak I (2013) The cystic fibrosis of exocrine pancreas. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(5):a009746.

- Yamada A, Komaki Y, Komaki F, et al (2018) Risk of gastrointestinal cancers in patients with cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 19:758–767.
- Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z (2012) CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): A systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 27:25–35.
- Zainal Abidin N, Haq IJ, Gardner AI, Brodlie M (2017) Ataluren in cystic fibrosis: development, clinical studies and where are we now? *Expert Opin Pharmacother* 18:1363–1371.
- Zhang Z, Liu F, Chen J (2017) Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding. *Cell* 170:483-491.e8.
- Zielenski J (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 117–133.
- Zielenski J, Tsui LC (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29:777–807.

Anexos

Nesta sessão de anexos, encontram-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo I**) referente ao estudo relatado no Capítulo I e os pareceres de aprovação do projeto nos comitês de ética e pesquisa das instituições (**Anexo II**). O **Anexo III** apresenta um artigo publicado durante o segundo ano da tese, contendo o primeiro protocolo de 11 variantes implementado no SUS/RS, proposto pelo nosso grupo. Além disso, os **Anexos IV e V** trazem artigos publicados em colaboração referentes a estudos relacionados com a FC e a triagem neonatal. Estes estudos foram realizados adjacientemente aos estudos apresentados nos capítulos I, II e III que compõem a presente tese.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Estudo de mutações em genes envolvidos na variabilidade clínica da fibrose cística

Pesquisadores responsáveis: Thaianie Rispoli Serrano, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Tarciana Grandi, Leonardo Araújo Pinto, Gilberto Bueno Fischer, Helena Mocelin, Simone Martins de Castro e Maria Lucia Rosa Rossetti

A fibrose cística (FC), também é conhecida como mucoviscidose. É uma doença de origem genética caracterizada pelo acúmulo de secreções em órgãos como, pulmões, pâncreas, intestino e testículo.

Estudos moleculares apontam que existem aproximadamente 2.000 mutações no gene *CFTR* que causam a FC, sendo a mais prevalente a mutação F508del. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar os achados clínicos e genéticos de pacientes e familiares de pacientes com FC, atendidos nas seguintes instituições: Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, Hospital São Lucas da PUCRS e Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Após a realização do consentimento informado, você ou seu filho será submetido a uma avaliação médica, com coleta de dados clínicos.

Você também será perguntado a consentir sobre a coleta de uma amostra de 8 ml de sangue, sua e do seu filho, que será utilizada para extração do DNA, para o estudo de mutações e genes associados à FC. As complicações da coleta de sangue são raras e geralmente pequenas, podendo ocorrer alguma dor ou certo desconforto em decorrência da picada da pele. A amostra de sangue, bem como os dados clínicos serão confidenciais e utilizados exclusivamente no estudo da FC. O DNA extraído ficará armazenado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT-FEPPS), sob a responsabilidade dos pesquisadores, com a possibilidade de ser utilizado em estudos futuros relacionados somente a esta doença. Nenhum outro teste ou pesquisa será feito sem a sua permissão por escrito, sendo que também não haverá nenhum custo para a realização destes exames.

Existe a possibilidade de que a participação neste estudo possa fazer você, ou o seu filho se sentirem emocionalmente desconfortáveis. No entanto, há uma equipe multidisciplinar com psicólogos que darão a você ou a seu filho o suporte necessário. A participação de vocês é inteiramente voluntária. *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de pedir desistência na participação desta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para o seu atendimento ou do seu filho dentro da Instituição onde o projeto está sendo realizado.* Não se dará qualquer informação genética sobre você ou seu filho, a outros membros da família, ou a terceiros sem sua permissão por escrito. Você receberá 01 (uma) cópia deste termo de consentimento.

“Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que serei submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo”.

Local:	Data:
Nome do Paciente:	
Cartão Nacional de Saúde:	
Nome do Responsável Legal:	
Documento de Identificação do Responsável Legal:	
_____	_____
Assinatura do Paciente (6-18 anos)	Assinatura do Responsável Legal
Pesquisador Responsável: Thaianie Rispoli Serrano	Telefone: (51) 3288-4036/8159-7165
_____	_____
Assinatura do Pesquisador Responsável	Assinatura do Médico Responsável
Data:	CRM

ANEXO II

Pareceres dos Comitês de Ética e Pesquisa das Instituições



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da fibrose cística

Pesquisador: Thaiane Rispoli Serrano

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 56475316.7.3003.5347

Instituição Proponente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Patrocinador Principal: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.626.480

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa referente ao doutorado de Thaiane Rispoli Serrano junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na UFRGS (razão pela qual o projeto foi encaminhado para o CEP UFRGS, na qualidade de co-partícipe).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal do projeto é associar a presença de mutações no gene CFTR e nos genes modificadores da FC com a gravidade da doença. Além disso, serão avaliadas, por biologia estrutural computacional, as interações entre variantes proteicas derivadas dessas mutações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto, em termos experimentais e contacto com seres humanos, envolve a coleta de sangue para avaliações genéticas e os riscos descritos concentram-se neste procedimento.

Não haverá benefício direto para o participante, mas são relatados benefícios referentes a um melhor conhecimento do perfil da doença em nossa região.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.626.480

A fibrose cística (FC) é uma doença genética de transmissão autossômica recessiva, cujas manifestações clínicas resultam da disfunção de uma proteína denominada proteína reguladora da condutância transmembranar na fibrose cística (CFTR). Já foram descritas aproximadamente de 2.000 mutações no gene CFTR, sendo a mutação F508del a mais frequente, porém, a frequência destas variantes tem uma variabilidade muito grande entre regiões geográficas e distintos grupos étnicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Há TCLE presente e adequado e uma série de Termos de compromisso de uso de banco de dados, de responsabilidade de divulgação e de concordância institucional. Por ser desenvolvido no âmbito da FEPPS, inclui termo de concordância da instituição em relação a participação de seus funcionários.

Há relato que os pacientes serão encaminhados pelo Laboratório de Referência de Triagem Neonatal do estado do RS que está localizado no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), portanto salienta-se a necessidade de avaliação do projeto pelo HMIPV (situação esta prevista no corpo do projeto).

Não foi realizado cálculo de tamanho amostral. Serão incluídos neste estudo todos os bebês triados pelo teste do pezinho na rede pública do Estado do RS no período entre julho de 2016 a agosto de 2018 que apresentarem dois resultados de IRT alterados, o que caracteriza uma amostra de conveniência.

O orçamento apresentado está adequado.

O cronograma prevê coletas entre 2016 - 2018.

Já existe aprovação do projeto por parte do CEP da FEPPS.

O TCLE está apresentado em linguagem clara e que possibilita a compreensão do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugere-se a aprovação do projeto, salientando a importância de incluir no TCLE os números de contacto telefônico de todos os CEP que o avaliarão.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 1.626.480

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721887.pdf	24/05/2016 17:24:33		Aceito
Outros	RG_thaiane.pdf	24/05/2016 17:22:12	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Capa.pdf	24/05/2016 17:21:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_do_banco_de_dados.pdf	24/05/2016 17:19:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_servidor_e_ou_CC_e_ou_estagiario.pdf	24/05/2016 17:18:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_divulgacao.pdf	24/05/2016 17:17:27	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Lista_dos_links_dos_CVs.pdf	24/05/2016 17:16:31	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	curriculo_lattes.pdf	24/05/2016 17:14:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Comprovante_de_vinculo_empregaticio.pdf	24/05/2016 17:13:56	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Simone.pdf	24/05/2016 16:13:19	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Leonardo.pdf	24/05/2016 16:12:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Gilberto.pdf	24/05/2016 16:12:30	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_realizacao_de_exames_e_procedimentos_nos_respectivos_servicos_da_fepps.pdf	24/05/2016 16:10:48	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_compromisso_de_utilizacao_de_material_biologico.pdf	24/05/2016 16:08:57	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Thaiane.pdf	24/05/2016 16:06:43	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoInformado_FC.pdf	24/05/2016 16:05:46	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_assinada.pdf	24/05/2016 16:03:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.626.480

PORTO ALEGRE, 07 de Julho de 2016

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da fibrose cística

Pesquisador: Thaiane Rispoli Serrano

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 56475316.7.0000.5320

Instituição Proponente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Patrocinador Principal: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.607.936

Apresentação do Projeto:

O projeto refere-se a um estudo molecular e computacional da Fibrose Cística no Rio Grande Do Sul.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Associar a presença de mutações no gene CFTR e nos genes modificadores da FC com a gravidade da doença. Além disso, avaliar por biologia estrutural computacional a interações protéicas entre elas.

Objetivos Específicos:

Expandir o painel utilizado pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do estado do RS para detectar as mutações no gene CFTR mais frequentes em diversas regiões do mundo

Avaliar a presença de mutações e polimorfismos em genes modificadores de FC (EHF, APIP, HLA-DRA) por sequenciamento.

Analisar a associação entre o genótipo e o fenótipo das mutações encontradas nos 12 indivíduos com FC.

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4097

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

Continuação do Parecer: 1.607.936

Analisar por biologia estrutural computacional as interações proteicas entre CFTR e EHF, APIP, HLA-DRA
Implantar um protocolo para caracterização de variantes genéticas no gene CFTR e genes modificadores (EHF, APIP, HLA-DRA) no Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do RS, através da melhor identificação dos fatores de risco para FC na população-alvo de recém-nascidos.

Ampliar os Laboratórios de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, o Laboratório de Triagem Neonatal do HMIPV e o Laboratório do CDCT/FEPPS para subsidiar projetos de pesquisa.

Formar recursos humanos na área de saúde e biologia molecular, abrangendo alunos de iniciação científica (alunos de graduação em áreas correlatas), especialização, mestrado e doutorado, auxiliando na capacitação técnico-científica.

Divulgar os resultados obtidos em Congressos, Reuniões Científicas e em Periódicos Indexados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Os riscos que existem são apenas os relacionados a uma coleta de sangue venoso.

Benefícios

Serão de um melhor conhecimento do perfil da doença em nossa região de forma a facilitar o seu entendimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa apresenta um tema relevante referindo-se a estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da Fibrose Cística auxiliando na genotipagem destas mutações que servirão para um melhor acompanhamento médico e qualidade de vida do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisa envolve Genética Humana mas não necessita de análise Ética por parte da CONEP.

O TCLE está adequado em linguagem acessível para o paciente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4097

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PRODUÇÃO E PESQUISA EM
SAÚDE/ FEPPS



Continuação do Parecer: 1.607.936

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721887.pdf	24/05/2016 17:24:33		Aceito
Outros	RG_thaiane.pdf	24/05/2016 17:22:12	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Capa.pdf	24/05/2016 17:21:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_do_banco_de_dados.pdf	24/05/2016 17:19:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_servidor_e_ou_CC_e_ou_estagiario.pdf	24/05/2016 17:18:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_divulgacao.pdf	24/05/2016 17:17:27	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Lista_dos_links_dos_CVs.pdf	24/05/2016 17:16:31	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	curriculo_lattes.pdf	24/05/2016 17:14:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Comprovante_de_vinculo_empregaticio.pdf	24/05/2016 17:13:56	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Simone.pdf	24/05/2016 16:13:19	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Leonardo.pdf	24/05/2016 16:12:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Gilberto.pdf	24/05/2016 16:12:30	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_realizacao_de_examens_e_procedimentos_nos_respectivos_servicos_da_fepps.pdf	24/05/2016 16:10:48	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_compromisso_de_utilizacao_de_material_biologico.pdf	24/05/2016 16:08:57	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Thaiane.pdf	24/05/2016 16:06:43	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoInformado_FC.pdf	24/05/2016 16:05:46	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_assinada.pdf	24/05/2016 16:03:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4097

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br

Continuação do Parecer: 1.607.936

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 16 de Junho de 2016

Assinado por:
Regis Domix Leal
(Coordenador)

Endereço: Avenida Ipiranga, 5.400

Bairro: Jardim Botânico

CEP: 90.610-000

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3288-4097

Fax: (51)3288-4069

E-mail: cep_fepps@fepps.rs.gov.br



HOSPITAL MATERNO
INFANTIL PRESIDENTE
VARGAS - HMIPV - RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da fibrose cística

Pesquisador: Thaiane Rispoli Serrano

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 56475316.7.3001.5329

Instituição Proponente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Patrocinador Principal: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.795.865

Apresentação do Projeto:

O projeto refere-se a um estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da Fibrose Cística no Rio Grande Do Sul.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Associar a presença de mutações no gene CFTR e nos genes modificadores da FC com a gravidade da doença. Além disso, avaliar por biologia estrutural computacional a interações proteicas entre elas.

Objetivo Secundário:

- Expandir o painel utilizado pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do estado do RS para detectar as mutações no gene CFTR mais frequentes em diversas regiões do mundo Avaliar a presença de mutações e polimorfismos em genes modificadores de FC (EHF, APIP, HLA-DRA) por sequenciamento.
- Analisar a associação entre o genótipo e o fenótipo das mutações encontradas nos indivíduos com FC.
- Analisar por biologia estrutural computacional as interações proteicas entre CFTR e EHF, APIP,

Endereço: Av. Independência 661- Bl. C 7º andar

Bairro: Independência

CEP: 90.035-076

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3289-3377

Fax: (51)3226-9075

E-mail: hmipv.cep@hmipv.prefpoa.com.br



Continuação do Parecer: 1.795.865

HLA-DRA Implantar um protocolo para caracterização de variantes genéticas no gene CFTR e genes modificadores (EHF, APIP, HLA-DRA) no Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do RS, através da melhor identificação dos fatores de risco para FC na população-alvo de recém-nascidos.

- Ampliar os Laboratórios de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, o Laboratório de Triagem Neonatal do HMIPV e o Laboratório do CDCT/FEPPS para subsidiar projetos de pesquisa.
- Formar recursos humanos na área de saúde e biologia molecular, abrangendo alunos de iniciação científica (alunos de graduação em áreas correlatas), especialização, mestrado e doutorado, auxiliando na capacitação técnico-científica.
- Divulgar os resultados obtidos em Congressos, Reuniões Científicas e em Periódicos Indexados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora refere que os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno derramamento de sangue no local da coleta formando um hematoma. Os benefícios são: auxiliar na genotipagem das mutações causadoras de fibrose cística, cuja informação poderá auxiliar no acompanhamento médico, prognóstico e qualidade de vida do paciente. Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço do conhecimento sobre a fibrose cística no RS, e mais especificamente contribuindo para o desenvolvimento de políticas públicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa apresenta um tema relevante, que trará benefícios para a equipe de saúde no diagnóstico da doença e na seleção do tratamento adequado aos portadores de fibrose cística.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados, alguns foram corrigidos e adicionados na plataforma em 27/10/2016.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Baseado na versão adicionada na plataforma em 27 de outubro de 2016 o projeto encontra-se ética e metodologicamente adequado, de acordo com a legislação em vigor.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Informamos que toda e qualquer alteração do projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP HMIPV.
2. O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento do projeto, bem

Endereço: Av. Independência 661- Bl. C 7º andar

Bairro: Independência

CEP: 90.035-076

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3289-3377

Fax: (51)3226-9075

E-mail: hmipv.cep@hmipv.prefpoa.com.br



HOSPITAL MATERNO INFANTIL PRESIDENTE VARGAS - HMIPV - RS



Continuação do Parecer: 1.795.865

como relatório final quando do término do mesmo.

3. Para o ingresso nas dependências do hospital o pesquisador responsável deverá solicitar ao CEP HMIPV a confecção de crachá para toda a equipe de pesquisa.

4. Para o início da pesquisa, o investigador deverá apresentar à chefia do serviço onde será realizada a pesquisa o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721887.pdf	24/05/2016 17:24:33		Aceito
Outros	RG_thaiane.pdf	24/05/2016 17:22:12	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Capa.pdf	24/05/2016 17:21:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_do_banco_de_dados.pdf	24/05/2016 17:19:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_servidor_e_ou_CC_e_ou_estagiario.pdf	24/05/2016 17:18:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_divulgacao.pdf	24/05/2016 17:17:27	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Lista_dos_links_dos_CVs.pdf	24/05/2016 17:16:31	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	curriculo_lattes.pdf	24/05/2016 17:14:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Comprovante_de_vinculo_empregaticio.pdf	24/05/2016 17:13:56	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Simone.pdf	24/05/2016 16:13:19	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Leonardo.pdf	24/05/2016 16:12:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Gilberto.pdf	24/05/2016 16:12:30	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_realizacao_de_exames_e_procedimentos_nos_respectivos_servicos_da_fepps.pdf	24/05/2016 16:10:48	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_compromisso_de_utilizacao_de_material_biologico.pdf	24/05/2016 16:08:57	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_doutorado_Thaiane.pdf	24/05/2016 16:06:43	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito

Endereço: Av. Independência 661- Bl. C 7º andar

Bairro: Independência

CEP: 90.035-076

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3289-3377

Fax: (51)3226-9075

E-mail: hmipv.cep@hmipv.prefpoa.com.br



HOSPITAL MATERNO
INFANTIL PRESIDENTE
VARGAS - HMIPV - RS



Continuação do Parecer: 1.795.865

Investigador	Projeto_doutorado_Thaiane.pdf	24/05/2016 16:06:43	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodeConsentimentoInformado_FC.pdf	24/05/2016 16:05:46	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_assinada.pdf	24/05/2016 16:03:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 27 de Outubro de 2016

Assinado por:
Maria da Graça Alexandre
(Coordenador)

Endereço: Av.Independência 661- Bl. C 7º andar

Bairro: Independência

CEP: 90.035-076

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3289-3377

Fax: (51)3226-9075

E-mail: hmipv.cep@hmipv.prefpoa.com.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização Clínica, Laboratorial e Funcional de Pacientes Pediátricos Portadores de Fibrose Cística no Sul do Brasil

Pesquisador: Leonardo Araujo Pinto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 49692115.7.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.723.091

Apresentação do Projeto:

O pesquisador principal do estudo: "Caracterização Clínica, Laboratorial e Funcional de Pacientes Pediátricos Portadores de Fibrose Cística no Sul do Brasil" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 22/03/2018, a emenda 2, com a solicitação de prorrogação do prazo de duração do projeto até 01/03/2021 e a inclusão das pesquisadoras LUÍSE SGARABOTTO PEZZIN e ELIANDRA DA SILVEIRA DE LIMA.

Objetivo da Pesquisa:

O pesquisador principal do estudo: "Caracterização Clínica, Laboratorial e Funcional de Pacientes Pediátricos Portadores de Fibrose Cística no Sul do Brasil" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 22/03/2018, a emenda 2, com a solicitação de prorrogação do prazo de duração do projeto até 01/03/2021 e a inclusão das pesquisadoras LUÍSE SGARABOTTO PEZZIN e ELIANDRA DA SILVEIRA DE LIMA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador principal do estudo: "Caracterização Clínica, Laboratorial e Funcional de Pacientes Pediátricos Portadores de Fibrose Cística no Sul do Brasil" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 22/03/2018, a emenda 2, com a solicitação de prorrogação do prazo de duração do projeto até 01/03/2021 e a inclusão das pesquisadoras LUÍSE SGARABOTTO PEZZIN e ELIANDRA DA SILVEIRA DE LIMA.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

Continuação do Parecer: 2.723.091

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador principal do estudo: "Caracterização Clínica, Laboratorial e Funcional de Pacientes Pediátricos Portadores de Fibrose Cística no Sul do Brasil" encaminhou ao CEP-PUCRS, em 22/03/2018, a emenda 2, com a solicitação de prorrogação do prazo de duração do projeto até 01/03/2021 e a inclusão das pesquisadoras LUÍSE SGARABOTTO PEZZIN e ELIANDRA DA SILVEIRA DE LIMA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas nas Resoluções nº 466 de 2012 (e suas complementares) e Norma Operacional nº 001 de 2013 do Conselho Nacional de Saúde, manifesta-se pela aprovação da emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1099367_E1.pdf	17/05/2018 09:43:32		Aceito
Outros	lattes.pdf	10/05/2018 11:17:55	Leonardo Araujo Pinto	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	10/05/2018 11:12:52	Leonardo Araujo Pinto	Aceito
Outros	Emenda_FC.pdf	22/03/2018 18:52:03	Leonardo Araujo Pinto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DocunificadosipesqFC2015.pdf	23/09/2015 17:10:08	Magali Lumertz	Aceito
Outros	TermoCompromisso.pdf	23/09/2015 17:08:46	Magali Lumertz	Aceito
Outros	Orcamentoaprovado.pdf	23/09/2015 17:08:02	Magali Lumertz	Aceito
Outros	CartaaprovacaoFCCCIPB2015.pdf	23/09/2015 17:06:50	Magali Lumertz	Aceito
Outros	Cartadeconhecimento.pdf	23/09/2015 17:04:13	Magali Lumertz	Aceito

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 2.723.091

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 19 de Junho de 2018

Assinado por:
Denise Cantarelli Machado
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo funcional de mutações em genes envolvidos com a variabilidade clínica da fibrose cística

Pesquisador: Thaiane Rispoli Serrano

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 56475316.7.3004.5683

Instituição Proponente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Patrocinador Principal: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.643.783

Apresentação do Projeto:

A fibrose cística (FC) é uma doença genética de transmissão autossômica recessiva, cujas manifestações clínicas resultam da disfunção de uma proteína denominada proteína reguladora da condutância transmembranar na fibrose cística.

Serão incluídos neste estudo todos os recém-nascidos triados pelo teste do pezinho na rede pública do Estado do RS em investigação para FC e adultos em acompanhamento do Hospital São Lucas da PUC/RS e da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. As amostras de sangue dos pacientes serão submetidas à extração dos ácidos nucléicos e será realizada uma ampliação do painel de detecção in house para aproximadamente 35 mutações pela metodologia SNaPshot. Com isso o estudo molecular e computacional da FC e de seus genes modificadores no RS permitirá um diagnóstico precoce, contribuindo com um melhor prognóstico do indivíduo.

Objetivo da Pesquisa:

Associar a presença de mutações no gene CFTR e nos genes modificadores da FC com a gravidade da doença. Além disso, avaliar por biologia estrutural computacional a interações protéicas entre elas.

Objetivos específicos

Endereço: Av. Independência, 155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

Continuação do Parecer: 1.643.783

Expandir o painel utilizado pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do estado do RS para detectar as mutações no gene CFTR mais freqüentes em diversas regiões do mundo

- Avaliar a presença de mutações e polimorfismos em genes modificadores de FC (EHF, APIP, HLA-DRA) por sequenciamento.

- Analisar a associação entre o genótipo e o fenótipo das mutações encontradas nos 12 indivíduos com FC.

Analisar por biologia estrutural computacional as interações proteicas entre CFTR e EHF, APIP, HLA-DRA

- Implantar um protocolo para caracterização de variantes genéticas no gene CFTR e genes modificadores (EHF, APIP, HLA-DRA) no Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do RS, através da melhor identificação dos fatores de risco para FC na população-alvo de recém-nascidos.

- Ampliar os Laboratórios de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, o Laboratório de Triagem Neonatal do HMIPV e o Laboratório do CDCT/FEPPS para subsidiar projetos de pesquisa.

- Formar recursos humanos na área de saúde e biologia molecular, abrangendo alunos de iniciação científica (alunos de graduação em áreas correlatas), especialização, mestrado e doutorado, auxiliando na capacitação técnico-científica.

- Divulgar os resultados obtidos em Congressos,

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - As complicações da coleta de sangue são raras e geralmente pequenas, podendo ocorrer alguma dor ou certo desconforto em decorrência da picada da pele.

Benefícios - O envolvimento de outros genes na definição destes fenótipos é relevante para a compreensão tanto da patogênese molecular quanto da relação genótipo - fenótipo. Com isso o estudo molecular e computacional da FC e de seus genes modificadores no RS permitirá um diagnóstico precoce, contribuindo com um melhor prognóstico do indivíduo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada consta , esta de acordo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE deverá constar os dados do comitê de ética em pesquisa do Hospital da Criança Santo Antônio, e deverá constar o termo de assentimento.

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

HOSPITAL DA CRIANÇA SANTO ANTÔNIO



Continuação do Parecer: 1.643.783

Recomendações:

- No projeto esta a coleta de sangue em 2ml e no termo esta em 8ml, sugiro adequar,
- Necessário termo de assentimento para menores de 18 anos,
- Adequar TCLE inserindo os dados do CEP/HCSA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos seguir as recomendações para alinhar o projeto às diretrizes Institucionais

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP:
relatórios parciais (pesquisas com duração superior a 6 meses)
relatórios finais (ao término da pesquisa) e os
resultados obtidos (cópia da publicação)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_721887.pdf	24/05/2016 17:24:33		Aceito
Outros	RG_thaiane.pdf	24/05/2016 17:22:12	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Capa.pdf	24/05/2016 17:21:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_do_banco_de_dados.pdf	24/05/2016 17:19:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_servidor_e_ou_CC_e_ou_estagiario.pdf	24/05/2016 17:18:32	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_de_divulgacao.pdf	24/05/2016 17:17:27	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Lista_dos_links_dos_CVs.pdf	24/05/2016 17:16:31	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	curriculo_lattes.pdf	24/05/2016 17:14:34	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Outros	Comprovante_de_vinculo_empregaticio.pdf	24/05/2016 17:13:56	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Simone.pdf	24/05/2016 16:13:19	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Leonardo.pdf	24/05/2016 16:12:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_anuencia_Gilberto.pdf	24/05/2016 16:12:30	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Declaração de	Autorizacao_para_realizacao_de_exa	24/05/2016	Thaiane Rispoli	Aceito

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

HOSPITAL DA CRIANÇA
SANTO ANTÔNIO



Continuação do Parecer: 1.643.783

Instituição e Infraestrutura	mes_e_procedimentos_nos_respectivos_servicos_da_fepps.pdf	16:10:48	Serrano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_de_compromisso_de_utilizacao_de_material_biologico.pdf	24/05/2016 16:08:57	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Thaiane.pdf	24/05/2016 16:06:43	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermodConsentimentoInformado_FC.pdf	24/05/2016 16:05:46	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_assinada.pdf	24/05/2016 16:03:59	Thaiane Rispoli Serrano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 21 de Julho de 2016

Assinado por:
Catiane Zanin Cabral
(Coordenador)

Endereço: Av. Independência,155

Bairro: INDEPENDENCIA

CEP: 90.035-074

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8997

Fax: (51)3214-8997

E-mail: cephcsa@santacasa.tche.br

ANEXO III

Artigo publicado: A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis

Provided by the Brazilian Public Health System



A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System

Thaiane Rispoli, MSc^{1,2}, Simone Martins de Castro, PhD^{3,4}, Tarciana Grandi, PhD², Mayara Prado, MSc^{1,2},
Letícia Filippin, MSc³, Cláudia Maria Dornelles da Silva, PhD², José Eduardo Vargas, PhD^{5,*}, and
Lucia Maria Rosa Rossetti, PhD^{1,2,6,*}

Cystic fibrosis newborn screening was implemented in Brazil by the Public Health System in 2012. Because of cost, only 1 mutation was tested - p.Phe508del. We developed a robust low-cost genetic test for screening 11 CFTR gene mutations with potential use in developing countries. (*J Pediatr* 2018;199:272-7).

Cystic fibrosis (CF-OMIM #219700) is an autosomal recessive genetic disease caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene (cytogenetic location: 7q31.2), which affects sodium, chloride, and bicarbonate homeostasis in epithelial cells.¹ This disease is highly prevalent ranging from 1 in 900 to 1 in 25 000 live births worldwide.² In Brazil, the incidence of cystic fibrosis is estimated to be 1 in 7576 live births.³

The normal newborn screening protocol used in Brazil is performed in sequential steps according to the age of newborns. First, an immunoreactive trypsinogen (IRT) dosage is conducted before 30 days of life. Borderline values (≥ 70 ng/mL) require a second collection. After this age, sweat test measures are carried out.⁴ However, these tests may be imprecise, leading to false-positive, false-negative, or even uncertain results.^{5,6} For this reason, clinical evaluations and conventional genetic tests (p.Phe508del analysis) may be requested.⁴

The p.Phe508del mutation is the most frequent, responsible for more than 48% of cystic fibrosis alleles in the population of Southern Brazil⁷ and 69.8% around the world (available at <http://cfr2.org>). However, 2023 mutations have already been described in the *CFTR* gene (available at <http://genet.sickkids.on.ca/>). A wide clinical variability of cystic fibrosis has been attributed to this high number of mutations.⁸ The expense of introducing a molecular diagnosis in public health centers, as a confirmatory test, still constitutes a barrier in developing countries.

Genetic testing can be combined with biochemical and clinical evidence, leading to a more accurate diagnostic approach. In 2012, cystic fibrosis newborn screening of the p.Phe508del mutation was implemented in Rio Grande do Sul, Brazil through Brazil's public health system (Sistema Único de Saúde [SUS]). Because of the cost, only 1 mutation was screened. To improve this situation, public Brazilian institutions (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, and Centro de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico) signed an agreement to create a more accurate complementary test for cystic fibrosis diagnosis to be implemented through SUS. Thus, our aim was to develop a robust inexpensive genetic test, SNaPshot, for screening simultaneously 11 *CFTR* gene mutations. In Brazilian newborn screening, it has been used as a complementary method to evaluate inconclusive results.

SNaPshot is a fast method with a minimum of hands-on time suited for the rapid screening of a large number of samples and multiple genetic variants in the same reaction.⁹

Methods

A total of 34 DNA samples from newborns screened by the Reference Service in Neonatal Screening of Rio Grande do Sul, where there was suspicion of cystic fibrosis were analyzed. The patients came from several regions of the state of Rio Grande do Sul and were screened for *CFTR* mutations using the newly optimized *CFTR* SNaPshot assay. The criteria for subject selection were 2 increased IRT values, borderline or an abnormal sweat test, and molecular testing for p.Phe508del (Wild type [Wt]/Wt or p.Phe508del/Wt) and previously genotyped using commercial genotyping kits Inno- LiPA *CFTR*19 and Inno- LiPA *CFTR*17+Tn (Innogenetics, Ghent, Belgium). As a negative control, a total of 45 DNA samples from the DNA databases of the Reference Service of newborns screening were tested.

The study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, and the parents

<i>CFTR</i>	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ddNTP	Dideoxynucleotide
IRT	Immunoreactive trypsinogen
PCR	Polymerase chain reaction (PCR)
SUS	Sistema Único de Saúde
Wt	Wild type

From the ¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre; ²Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), Departamento de Ações em Saúde (DAS), Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES-RS), Porto Alegre; ³Serviço de Referência em Triagem Neonatal, Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV), Porto Alegre; ⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre; ⁵Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo; and ⁶Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

*Contributed equally.

Supported by Programa de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, 1260-2551/13-0). The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.03.047>

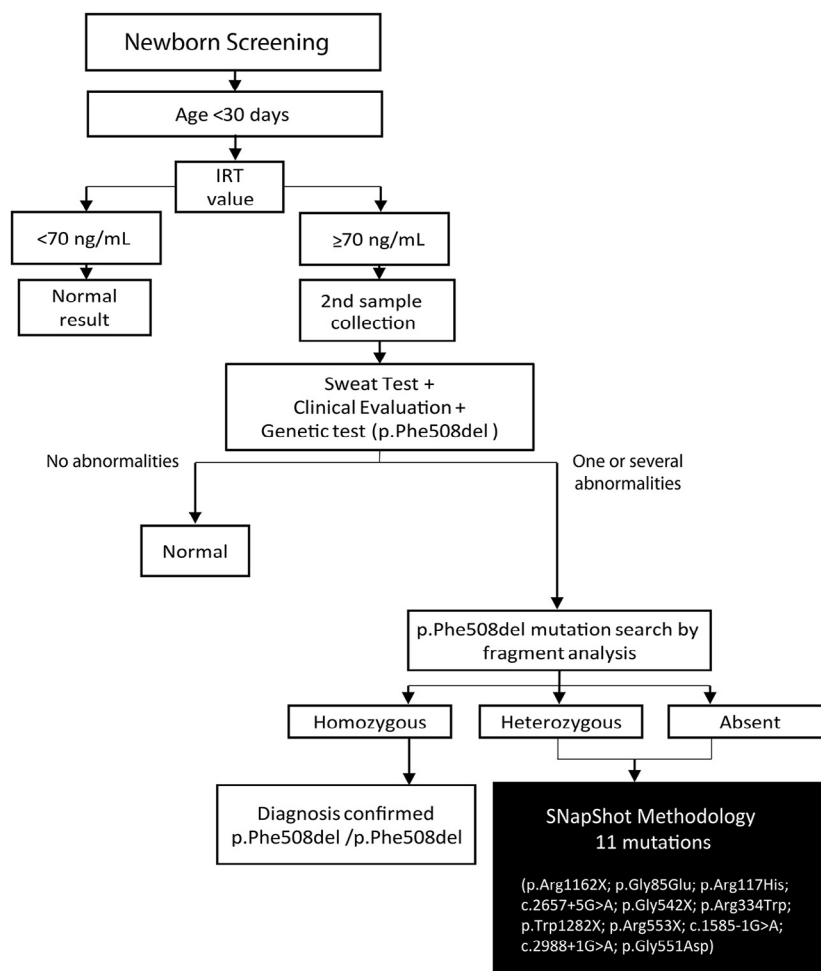


Figure 1. Representation of the flowchart of newborn screening performed in the state of Rio Grande do Sul. The white boxes represent the actual genetic screening for cystic fibrosis in Brazil. Our SNaPshot strategy as complementary screening for cystic fibrosis is located in the black box.

of the subjects gave written informed consent for the participation in the study. A flowchart of neonatal screening performed in this work is represented in **Figure 1**.

Mutations Selection

The mutations that comprise the panel (p.Arg1162X, p.Gly85Glu, p.Arg117His, c.2657 + 5G>A, p.Gly542X, p.Arg334Trp, p.Trp1282X, p.Arg553X, c.1585-1G>A, c.2988 + 1G>A, and p.Gly551Asp) were selected according to their previously described potential relevance in Southern Brazil (state of Rio Grande do Sul) and in the Brazilian population among the 2000 mutations that have previously been described.^{7,10-13} In addition, the most frequent mutations in European populations (populations mainly from Italy, Spain, Portugal, and Germany) stored in the cystic fibrosis mutation database “CFTR1” (<http://www.genet.sckkids.on.ca/cftr>) were considered for inclusion in the panel because of the great migration of European people to Southern Brazil. Mutations were also considered if they were present in the commercial test.

A second cystic fibrosis mutation database “CFTR2” (<http://www.cftr2.org>) was also used. This database collects the most recent information on newly discovered *CFTR* gene mutations, classifies them as disease-causing, neutral, or mutations of varying clinical consequences, and provides clinical information on specific mutation combinations.

Primer Design and Validation: Multiplex Polymerase Chain Reaction and SNaPshot

The primers design of the multiplex polymerase chain reaction (PCR) and the SNaPshot (**Tables I and II**; available at www.jpeds.com) was performed using Primer3 software v.0.2 (Whitehead Institute, Cambridge, UK; <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), and the specificity was confirmed in silico using BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and experimentally by Sanger sequencing, where each amplicon was sequenced on an ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California), according to the

manufacturer's procedures. After that, 11 different DNA fragments with lengths ranging from 152 bp to 388 bp were amplified in a multiplex reaction and used for CFTR mutation detection.

Multiplex PCR Amplification

The multiplex PCR amplification was performed in a 25 μ L reaction volume with 20 ng of genomic DNA. In addition, each reaction contained 12.5 μ L of 1X Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 80 nM of p.Arg117His primers, 400 nM of p.Gly551Asp primers, 1200 nM of p.Arg553X primers, 160 nM of p.Trp1282X, p.Arg334Trp, p.Arg1162X, c.2988 + 1G>A primers, 240 nM of c.1585-1G>A, c.2657 + 5G>A, p.Gly85Glu, p.Gly542X primers, and 3.3 μ L of ultrapure water.

All reactions were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the following settings: predenaturation at 95°C for 15 minutes followed by 35 cycles of 30 seconds at 94°C (denaturation), 1 minute 30 seconds at 58°C (annealing), 1 minute at 72°C (elongation), and a final extension step at 72°C for 15 minutes. Multiplex PCR products were subjected to gel electrophoresis using an 8% minipolyacrylamide gel (0.75 mm thickness, 8 cm height) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) in 1X TBE at 110 V (constant voltage) for 4 hours at room temperature. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL) in 100 mL of 1X TBE for 10 minutes and photographed with a UV transilluminator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).

To remove unincorporated nucleotides and excess primers, 5 μ L of PCR product was purified with 2 μ L of ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, California) for 60 minutes at 37°C followed by enzyme heat inactivation for 20 minutes at 80°C.

Previous DNA quantification was performed; please see the additional method section ([Appendix](#); available at www.jpeds.com).

CFTR Multiplex SNaPshot

The SNaPshot assay is based on the hybridization of the oligonucleotide primer adjacent immediately to the variant nucleotide analyzed and extension with complementary fluorescently labeled dideoxynucleotide (ddNTP). Additional technical details on this method can be accessed in a previous work done by our group.¹⁴

A SNaPshot reaction was performed in 12 μ L volume using 5 μ L of SNaPshot Multiplex Ready Reaction mix (Life Technologies, Carlsbad, California), 3 μ L of purified PCR multiplex mix, and 0.15 μ L of extension primer mix (0.05 μ M of each primer), ([Table II](#)). Reactions were performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) with the following cycling conditions: 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles of 96°C for 10 seconds, 50°C for 5 seconds, and 60°C for 30 seconds. The unincorporated ddNTPs were removed from the reaction mix by adding 1U shrimp alkaline phosphatase (Affymetrix) at 37°C for 60 minutes, followed by enzyme heat inactivation for 20 minutes at 80°C.

Capillary Electrophoresis

For capillary electrophoresis 1 μ L of purified SNaPshot product was mixed with 9 μ L of HiDi formamide (Life technologies, Carlsbad, California) and 0.5 μ L of standard size GeneScan-120LIZ (Life technologies) and denatured for 5 minutes at 95°C. The samples were then separated and detected by capillary electrophoresis on an ABI 3130 \times 1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), using POP-4 polymers and 36-cm length capillaries. Thus, the mutation sites could reliably be differentiated among homozygous Wt, homozygous mutant, or heterozygous alleles by the incorporated dye-labeled ddNTPs.

To analyze the electrophoresis data, the peak signal was analyzed with GeneMapper software v 4.0 (Applied Biosystems); the dye color of the fragment was used to identify the nucleotide of interest. For the SNaPshot assay, a color was assigned to individual ddNTPs as follows: green/A, black/C, blue/G, and red/T. The SNaPshot reaction produced one (homozygous) or 2 (heterozygous) peaks depending on the genotype at this locus.

Sequence Analysis

PCR products were sequenced in both directions using PCR primers and, the Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) according to the protocol provided by the manufacturer. The reactions were sequenced using the ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The obtained sequences were then compared with the Wt controls using Lasergene (DNASTAR, Madison, Wisconsin) software. For additional details, please see the supplementary method section ([Appendix](#)).

Statistical Analyses

Cohen kappa was used to provide a measure of agreement between the methods. Sensitivity and specificity parameters were also analyzed. IBM SPSS Statistic software v 2.1 (Westlands Road, Quarry Bay, Hong Kong) was used for statistical analysis, and the statistical significance considered was $P < .001$.

Results

The quality and concentration of amplified products obtained by multiplex PCR is essential for the performance of the SNaPshot assay. Details of primer sequences used for the multiplex and SNaPshot reaction are shown in [Tables I and II](#), respectively. Sufficient amounts of the 11 amplicons were obtained ([Figure 2, A](#)). After this process, optimization of the SNaPshot reaction was carried out. All primers were multiplexed in 1 CFTR SNaPshot mix ([Figure 2, B](#)). Electrophoretic mobility of the amplicons and fragment sizes were in agreement with those obtained individually. The electropherogram showed specific peak results in the SNaPshot final panel ([Figure 3, A and B](#); available at www.jpeds.com), where an example of p.Arg334Trp heterozygous mutation can be seen.

The DNA samples tested by this CFTR SNaPshot strategy showed perfect overlapping with the results obtained by the commercial kit Inno-LiPA and DNA sequencing, demonstrating that the new assay is highly accurate (Kappa 1.00),

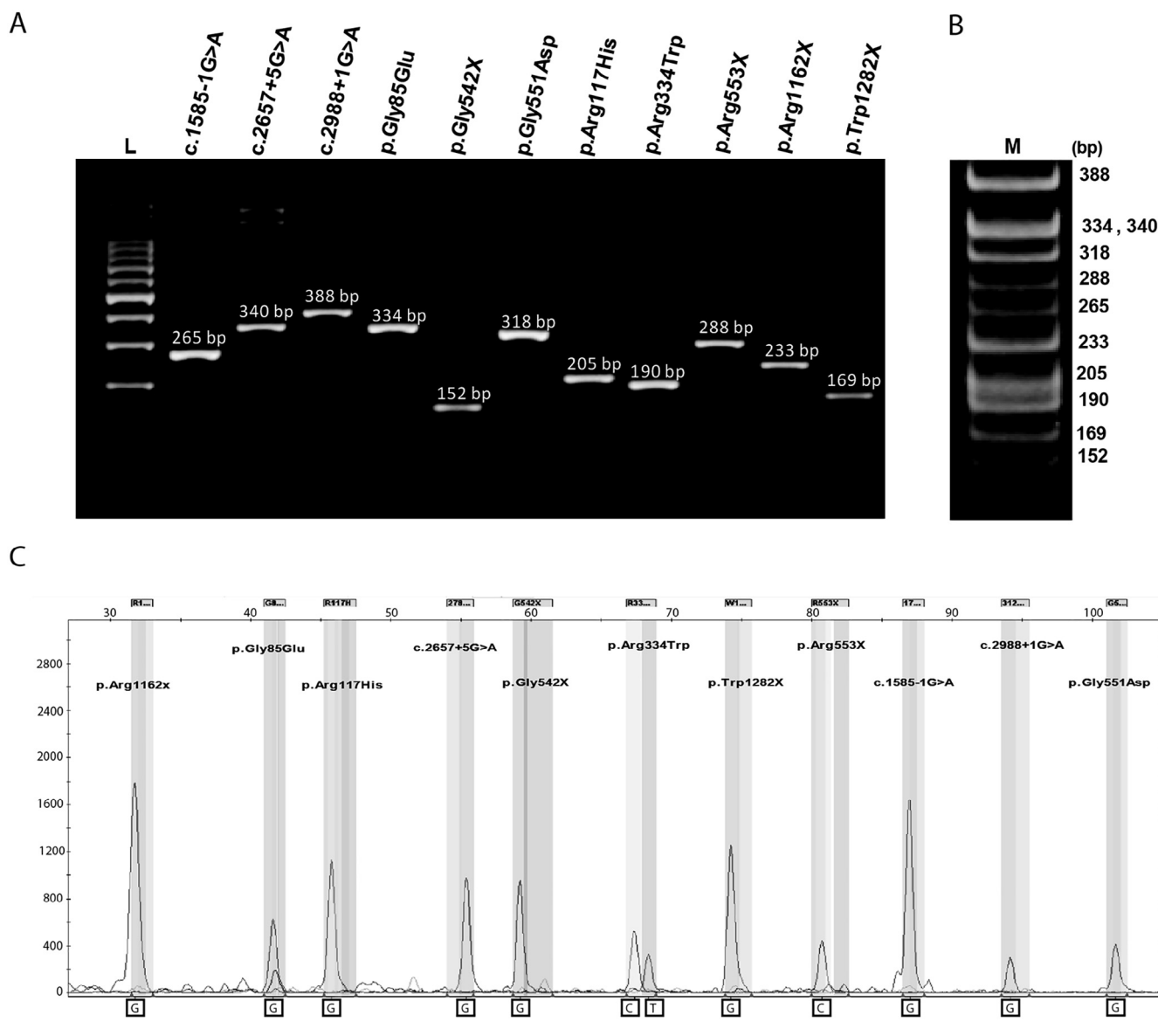


Figure 2. General representation of the results obtained from the SNaPshot optimization. **A**, Analysis of the amplicons of the 11 regions studied in 3% agarose gel electrophoresis (120 V for 2 hours) to confirm the primers' efficiency, L = DNA ladder 100 bp. **B**, Analysis of optimized multiplex PCR products in 8% polyacrylamide gel electrophoresis (110 V for 4 hours). M = Multiplex PCR amplicon. **C**, Electropherograms of SNaPshot for detection of 11 CFTR mutations in 1 sample along with standard size GeneScan 120 LIZ. An example of p.Arg334Trp heterozygous mutation can be seen.

(**Figure 3**). In addition, based on sample analysis, the overall sensitivity and specificity of SNaPshot was 84% (CI 95%; 74.2%-93.7%) and 100% (CI 95%; 99%-100%), respectively, for the classic group and 6.6% (CI 95%; 0%-6.6%) and 100% (CI 95%; 99%-100%), respectively, for the nonclassic group.

Using our methodology to detect 11 mutations, 4 mutations (p.Gly542X, p.Trp1282X, c.2988 + 1G>A, and p.Arg334Trp) were identified and confirmed by commercial genotyping kits (Inno-LiPA CFTR19 and Inno-LiPA CFTR17 + Tn) and by DNA sequencing. The 34 samples were divided into 2 groups according to the level of suspicion of cystic fibrosis: in the first group (classic cystic fibrosis), 19 of 34 (55.9%) samples had altered IRT tests, altered sweat tests,

and molecular testing for p.Phe508del (Wt/Wt or p.Phe508del/Wt). In the second group (nonclassic cystic fibrosis), 15 of 34 (44.1%) presented just 1 matching criteria or clinical symptom.

In the first group, mutated alleles were found in 8 of 38 (21.1%) samples. These were distributed as follows: 4 of 38 (10.5%) carrying p.Gly542X mutation, 2 of 38 (5.2%) carrying c.2988 + 1G>A mutation, 1 of 38 (2.6%) carrying p.Trp1282X mutation, and 1 of 38 (2.6%) carrying p.Arg334Trp mutation (**Table III**; available at www.jpeds.com). In the second group, a Trp1282X mutation was identified in 1 of 30 (3.3%) of the samples, (**Table III**).

The individual genotypes established including the p.Phe508del previous information were as follows: 9 (26.5%)

were p.Phe508del/unknown, 2 (5.9%) were p.Gly542X/p.Phe508del, 1 (2.9%) was p.Gly542X/p.Gly542X, 1 (2.9%) was p.Trp1282X/p.Phe508del, 1 (2.9%) was c.2988 + 1G>A/p.Phe508del, 1 (2.9%) was defined c.2988 + 1G>A/unknown, 1 (2.9%) was defined p.Trp1282X/unknown, and 1 (2.9%) was p.Arg334Trp/p.Phe508del. Seventeen (50%) samples did not carry any of the mutations tested (**Table IV**; available at www.jpeds.com).

Discussion

In the first month of life of an individual, newborn screening is carried out by 2 determinations of the level of IRT. However, the rate of false-positive can be elevated in various situations unrelated to cystic fibrosis.¹⁵ A negative screening test makes cystic fibrosis unlikely, but does not rule it out, and further testing should be performed whenever the disease is suspected on clinical grounds.⁴ A chloride measurement in sweat, in 2 samples, constitutes the first stage to confirm cystic fibrosis and is 96.5% sensitive and 99% specific. The value of this test depends crucially on quality control in its performance and assessment, which is a requirement for certified cystic fibrosis centers. Patients with a positive or a borderline sweat test should undergo molecular genetic testing to confirm the diagnosis, enable family genetic counseling, and determine whether the option of mutation-specific treatment exists.¹⁶

In the present study, 34 individuals with classic and nonclassic cystic fibrosis, previously screened by the Newborn Screening Service of Southern Brazil, were selected for the extended molecular test (performed and optimized in this study). Eleven mutations (p.Arg1162X, p.Gly85Glu, p.Arg117His, c.2657 + 5G>A, p.Gly542X, p.Arg334Trp, p.Trp1282X, p.Arg553X, c.1585-1G>A, c.2988 + 1G>A, and p.Gly551Asp) were included in the test. This panel was built and optimized with the goal of complementing screening that currently provides only molecular analysis of the p.Phe508del mutation, which is the most frequent mutation in individuals with cystic fibrosis, being provided currently by SUS (**Figure 1**).

The method chosen to accomplish this task was the SNaPshot technique because of its simplicity after optimization, accuracy, and reliability.^{17,18} Data obtained using this technique can be easily analyzed using the GeneMapper software, thus, making it less susceptible to human error and time analysis. Moreover, this strategy can identify 11 mutations with a high discrimination power in the same reaction and in the same capillary electrophoresis (**Figure 2, C**). Another 2 criteria were also prioritized: high sensitivity to genotyping and low cost.

Some samples showed no hybridization using commercial genotyping methods, demonstrating that these tests may fail to perform the analysis as verified by our group (data not shown). Especially in these cases, the sequencing carried out was relevant because it allowed the confirmation of the genotypes performed by our method. These facts corroborate the ability of the SNaPshot technique to detect mutations even in poor quality samples.

Based on material cost analysis, we calculated an approximate expense of US\$9.00 per patient sample. This cost is about

10% of the commercial values using other molecular tests. It is important to note that this data is based on the costs of reagents and does not consider laboratory staff. On the other hand, the SNaPshot technique required less than 2.5 days of laboratory work, and 34 samples could be analyzed simultaneously by 1 technician.

As an additional test, the allele frequency was quantified from our genetic panel, identifying another 9 allelic variants besides p.Phe508del (**Table III**). In addition, genotype analysis confirmed a fibrocystic diagnosis in some newborn patients, in whom cystic fibrosis suspicious was based on conventional biochemical tests (**Table IV**). However, this data showed that 17 of 34 samples tested did not have any of the included mutations, 3 cases possessed classic cystic fibrosis and 14 presented nonclassic cystic fibrosis. Two hypotheses may explain the low sensitivity in the nonclassic cystic fibrosis outcome group. The first hypothesis might suggest that individuals are false-positive for IRT because it is common especially in neonates who have suffered perinatal stress or had low Apgar scores or were of African descent.⁶ Especially in these cases, the clinical symptoms should be considered paramount and the individuals should be referred for follow-up. The second hypothesis is that the customized panel does not include mutations present in these individuals, which could promote mild/moderate pathogenic phenotypes. Based on our results with this panel, future approaches will be developed to increase the number of detected mutations and, therefore, a higher sensitivity.

There were no observed cases for p.Arg1162X, p.Arg117His, c.2657 + 5G>A, p.Arg553X, c.1585-1G>A, p.Gly85Glu, and p.Gly551Asp mutations, but it is important to note that we selected primer sets for the SNaPshot technique because of the high frequency of these mutations in the Brazilian population.^{10,12,19-21}

In conclusion, this work proposed a new low-cost and simple strategy to diagnose cystic fibrosis in neonatal screening. This complementary strategy has the potential to be implemented as a diagnosis routine in other developing countries apart from Brazil. ■

We thank Fabiana Quoos Mayer for the English review of this paper.

Submitted for publication Oct 20, 2017; last revision received Mar 14, 2018; accepted Mar 19, 2018

Reprint requests: José Eduardo Vargas, PhD, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: josevargas@upf.br

References

1. Hwang TC, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a009498.
2. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-904.
3. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, et al. 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 Fibrosis* 2008;7:15-22.

4. Athanazio RA, Silva Filho L, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianny E, et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2017;43:219-45.
5. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev* 2005;26:135-53.
6. Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW 3rd, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics* 2007;119:e495-518.
7. Fauz FR, Souza DA, Olandoski M, Raskin S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet* 2010;55:71-6.
8. Pereira SV, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1 and SLC9A3). *Gene* 2017;629:117-26.
9. Bender K. SNaPshot for pharmacogenetics by minisequencing. *Methods Mol Biol* 2005;297:243-52.
10. Streit C, Burlamaque-Neto AC, de Abreu e Silva F, Giugliani R, Saraiva Pereira ML. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Genet Metab* 2003;78:259-64.
11. Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6:387-91.
12. Perone C, Medeiros GS, del Castillo DM, de Aguiar MJ, Januario JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:134-8.
13. Sih T, Godinho R, Franco LP, Piltcher O. Cystic fibrosis: Brazilian ENT experience. *Int J Otolaryngol* 2012;2012:204696.
14. Prado MJ, de Castro SM, Kopacek C, de Mello MP, Rispoli T, Grandi T, et al. Development of CYP21A2 genotyping assay for the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Mol Diagn Ther* 2017;21:663-75.
15. Sontag MK, Corey M, Hokanson JE, Marshall JA, Sommer SS, Zerbe GO, et al. Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *J Pediatr* 2006;149:650-7.
16. Naehrig S, Chao CM, Naehrlich L. Cystic fibrosis. *Dtsch Arztebl Int* 2017;114:564-74.
17. Touati A, Blouin Y, Sirand-Pugnet P, Renaudin H, Oishi T, Vergnaud G, et al. Molecular epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae*: genotyping using single nucleotide polymorphisms and SNaPshot technology. *J Clin Microbiol* 2015;53:3182-94.
18. Latini FR, Gazito D, Arnoni CP, Muniz JG, de Medeiros Person R, Carvalho FO, et al. A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. *Blood Transfus* 2014;12(Suppl 1):s256-63.
19. Raskin S, Pereira L, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Valentim L, et al. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test* 2003;7:213-8.
20. Cabello GM, Cabello PH, Otsuki K, Gombarovits ME, Llerena JC Jr, Fernandes O. Molecular analysis of 23 exons of the CFTR gene in Brazilian patients leads to the finding of rare cystic fibrosis mutations. *Hum Biol* 2005;77:125-35.
21. Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. [Cystic fibrosis at a Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity]. *J Pediatr (Rio J)* 2004;80:371-9.

Appendix

DNA Quantification

The DNA from peripheral blood was isolated by salting out method¹ and the concentrations were assessed by fluorometric analysis using a Qubit fluorimeter according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, California). To validate and determine the reproducibility and performance (specificity and sensitivity) of the single-nucleotide primer extension (SNaPshot; Applied Biosystems) method for detection of *CFTR* mutations, the 34 samples were genotyped using the commercial genotyping kits Inno-LiPA *CFTR*19 and Inno-LiPA *CFTR*17+Tn Update Kits (Innogenetics) and sequenced (ABI 3130 × 1 Genetic Analyzer; Applied Biosystems).

Sequence Analysis

Sequence analysis was also performed using Sanger sequencing assay (for the 11 regions of mutations) as another way to

confirm the genotypes obtained using the SNaPshot and the commercial test. The amplified fragments were obtained by single PCR using 20 ng of genomic DNA extracted from blood, 20 pmol of each oligonucleotide, 200 mM of deoxyribonucleoside triphosphatase, 2 mM MgSO₄, 1 × PCR Buffer without Mg, and 0.2 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a total reaction volume of 30 μL. Cycling parameters were 1 cycle of denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 62°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 45 seconds. The final extension step was followed by 7 minutes incubation at 72°C. Following PCR cycling, unincorporated primers and dNTPs were removed by adding 2 μL of Affymetrix ExoSAP-IT to each reaction. The reactions were incubated at 37°C for 30 minutes, and then inactivated by heating at 80°C for 20 minutes. The amplification cycling profile was performed in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Table I. Primers and reaction conditions used for multiplex PCR amplification of 11 *CFTR* regions

Mutations analyzed	Reference SNP	Primer name*	Sequence (5'→3' direction)	Amplicon sizes (base pairs)	Concentration in mix† (nM)
c.1585-1G>A	76713772	1717-1G>A_FOR 1717-1G>A_REV	CAGCAATGTTGTTTTGACCA CTTGCTCGTTGACCTCCACT	265	240
c.2657 + 5G>A	80224560	2789 + 5G>A_FOR 2789 + 5G>A_REV	GCATGGGAGGAATAGGTGAA CTGAACCTCTGGGCTCAAGT	340	240
c.2988 + 1G>A	75096551	3120 + 1G>A_FOR 3120 + 1G>A_REV	TTTGGGTTCTGAATGCGTCT GGCCAGGTAAGCAGTTCTGA	388	160
p.Gly85Glu	75961395	G85E_FOR G85E_REV	GGGATAGAGAGCTGGCTTCA ATTTTGCTGAGCCATTGAG	334	240
p.Gly542X	113993959	G542X_FOR G542X_REV	AGGAAGATGTGCCTTCAAATTCA TTGCTCGTTGACCTCCACTC	152	240
p.Gly551Asp	75527207	G551D_FOR G551D_REV	CAGCAATGTTGTTTTGACCA ACAGCAAATGCTTGCTAGACC	318	400
p.Arg117His	78655421	R117H_FOR R117H_REV	CCCCTTTGTAGGAAGTCAAC TAGCTATTCTCATCTGCATTCCA	205	80
p.Arg334Trp	121909011	R334W_FOR R334W_REV	GGAAAGCAGCCTATGTGAGA GTTTGTACAGCCCAGGGAAA	190	160
p.Arg553X	74597325	R553X_FOR R553X_REV	GCCTTTCAAATTCAGATTGAGC CTAGCCATAAACCCAGGA	288	1200
p.Arg1162X	74767530	R1162X_FOR R1162X_REV	CGAGAGTTGGCCATTCTTGT CATTGAAAAGCCCGACAAAT	233	160
p.Trp1282X	77010898	W1282X_FOR W1282X_REV	TTGGGAAGAAGTGGATCAGG CTGGCTAAGTCTTTTGTCTCA	169	160

*Primer sets used in PCR multiplex and sequence analysis.

†Concentration in the multiplex PCR primer mix adjusted to result in similar amounts of amplification products.

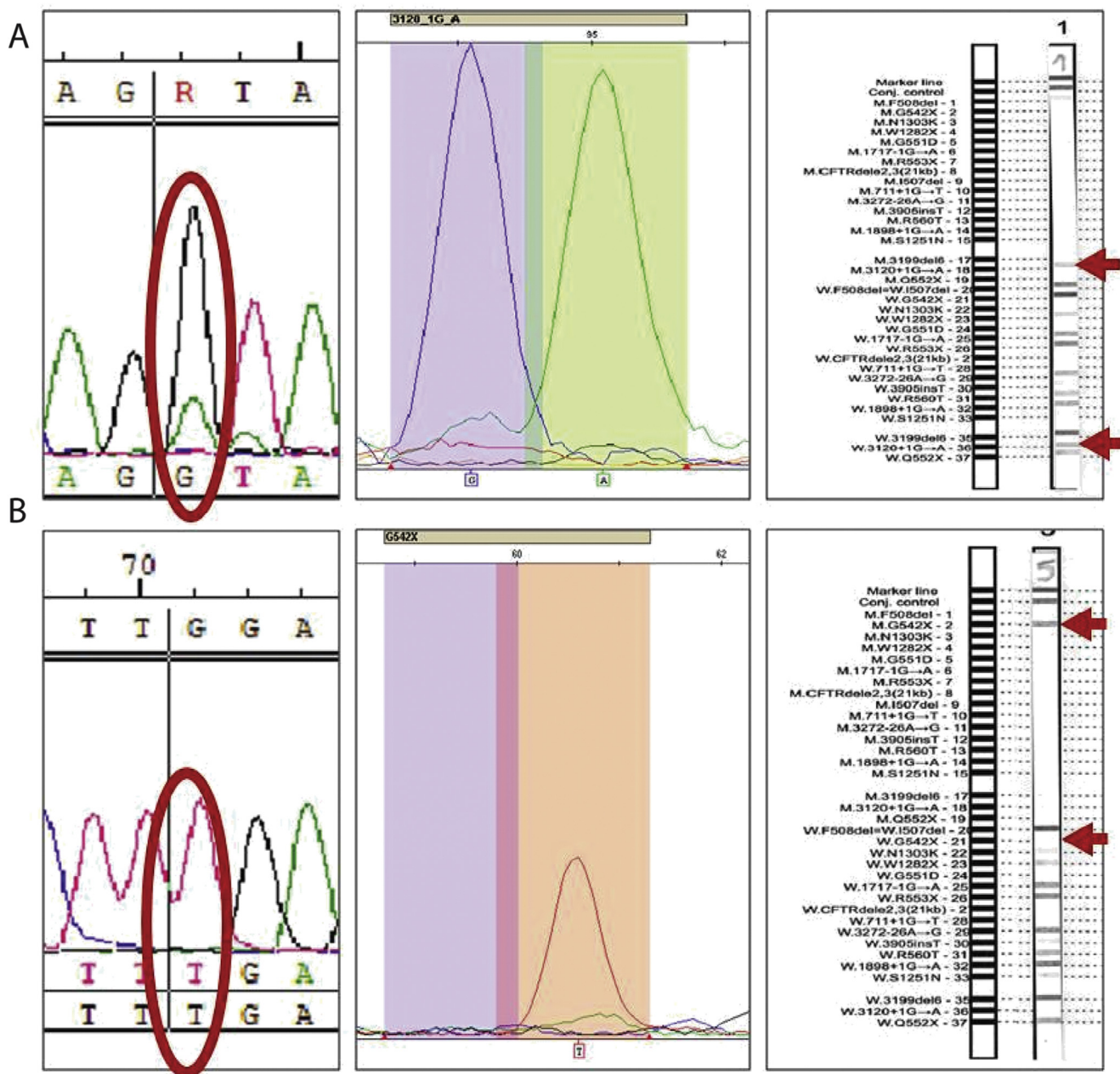


Figure 3. Comparison and confirmation of the results obtained by SNaPshot with commercial genotyping assay and sequencing. **A**, Detection of c.2988 + 1G>A mutation (heterozygote). On the left, the figure shows a sequencing pattern SNP T/A. The SNaPshot electropherogram can be seen in the middle confirming sequencing results. On the right, the figure shows the result of the hybridization on the strip in the Wt allele and the mutant allele. **B**, Detection of p.Gly542X mutation (homozygote). On the left, the figure shows a sequencing pattern SNP T. The SNaPshot electropherogram can be seen in the middle confirming sequencing results. On the right, the figure shows the result of the hybridization on the strip in the Wt allele and the mutant allele.

Table II. Primers and reaction conditions used for CFTR Multiplex SNaPshot assay

CFTR mutations	Sequence (5'→3' direction)	Orientation	SNaPshot Result (normal/mutant allele)	Primer length (base pairs)	Size of peak (normal/mutant allele)
p.Arg1162X	CTGTTGGCATGTCAATGAACCTAAAGACTC	Reverse	G/A	30	31.59/35.05
p.Gly85Glu	CTTCGGCGATGTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATG	Forward	G/A/T	37	41.50/43.76/45.34
p.Arg117His	GGGAAGAATCATAGCTTCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAAC	Forward	G/A/C/T	44	45.55/47.14/47.8/49.23
c.2657 + 5G>A	CCATTCCAGGTGGCTGCTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTTGAAAAGTGA	Forward	G/A	51	55.03/57.42
p.Gly542X	TTTCTATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGACAGAAAAGACAATATA GTTCTT	Forward	G/T	58	58.70/61.63
p.Arg334Trp	TCTCAGGGTTCCTTGTGGTGTTTTATCTGTGCTCCCTATGCACATATCAAA GGAATCATCCTC	Forward	C/T	65	67.12/69.55
p.Trp1282X	GAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAAATCCAGATCGATGGTGTGCTTGGGAT TCAATAACTTTGCAACAGTG	Forward	G/A	72	73.80/76.52
p.Arg553X	GTAATAGGACATCTCCAAGTTTGACAGAAAAGACAATATAGTTCTTGAGAAG GTGGAATCACACTGAGTGGAGTCAA	Forward	C/G/T	79	80.54/81.58/82.36
c.1585-1G>A	ATGATTACATTAGAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGATTGAGCATACTAAA AGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTTGGTAATA	Forward	G/A	86	86.50/88.80
c.2988 + 1G>A	TTGTATATTATAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAGATATAGCAATTTGG ATGACCTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAG	Forward	G/A	93	93.63/96.39
p.Gly551Asp	AGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGACAGAG AAAGACAATATAGTTCTTGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAG	Forward	G/A	100	101.11/103.63

Table III. Allelic frequencies of common cystic fibrosis mutations

Mutations	Class	Location	Total clinical suspicion of cystic fibrosis		Classic cystic fibrosis		Nonclassic cystic fibrosis	
			n alleles	Frequency (%)	n alleles	Frequency (%)	n alleles	Frequency (%)
p.Arg1162X	I	Exon 19	0	0.0	0	0.0	0	0.0
p.Gly85Glu	II	Exon 3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
p.Arg117His	IV	Exon 4	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.2657 + 5G>A	V	Exon 14b	0	0.0	0	0.0	0	0.0
p.Gly542X	I	Exon 11	4	5.9	4	10.5	0	0.0
p.Arg334Trp	IV	Exon 7	1	1.5	1	2.6	0	0.0
p.Trp1282X	I	Exon 20	2	2.9	1	2.6	1	3.3
p.Arg553X	I	Exon 11	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.1585-1G>A	I	Intron 11	0	0.0	0	0.0	0	0.0
c.2988 + 1G>A	I	Intron 16	2	2.9	2	5.3	0	0.0
p.Gly551Asp	III	Exon 11	0	0.0	0	0.0	0	0.0
p.Phe508del	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

n, number.

Table IV. Genotypic frequencies of tested population using standardized SNaPshot assay

Genotypes	Clinical Suspicion of cystic fibrosis (n = 34)			
	Classic cystic fibrosis		Nonclassic cystic fibrosis	
	n	Frequency (%)	n	Frequency (%)
p.Gly542X /p.Gly542X	1	5.26	0	0.00
p.Gly542X /p.Phe508del	2	10.53	0	0.00
p.Trp1282X /p.Phe508del	1	5.26	0	0.00
c.2988 + 1G>A /p.Phe508del	1	5.26	0	0.00
c.2988 + 1G>A /unknown	1	5.26	0	0.00
p.Trp1282X /unknown	0	0.00	1	6.67
p.Arg334Trp /p.Phe508del	1	5.26	0	0.00
p.Phe508del /unknown	9	47.37	0	0.00
unknown /unknown	3	15.79	14	93.33
Total	19	100	15	100

ANEXO IV

**Artigo publicado: Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with
cystic fibrosis in Southern Brazil**



Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with cystic fibrosis in Southern Brazil

Katiana Murieli da Rosa^{1,a}, Eliandra da Silveira de Lima^{2,b},
Camila Correia Machado^{3,c}, Thaiane Rispoli^{4,d}, Victória d'Azevedo Silveira^{3,e},
Renata Ongaratto^{2,f}, Talitha Comaru^{2,g}, Leonardo Araújo Pinto^{5,h}

1. Pediatric Residency Program, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.
 2. Post-Graduate Degree in Pediatrics and Children's Health, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.
 3. Medical School, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.
 4. Post-Graduate Degree in Cell and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.
 5. Centro Infantil, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.
- a. <http://orcid.org/0000-0001-7120-3022>
b. <http://orcid.org/0000-0003-2350-9443>
c. <http://orcid.org/0000-0001-5138-3046>
d. <http://orcid.org/0000-0003-4421-8995>
e. <http://orcid.org/0000-0002-3264-0374>
f. <http://orcid.org/0000-0003-0217-3792>
g. <http://orcid.org/0000-0002-3574-6318>
h. <http://orcid.org/0000-0002-3906-5456>

Submitted: 20 November 2017.
Accepted: 12 August 2017.

Study carried out at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brazil.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a genetic autosomal recessive disorder, more common in Euro-descendant populations, caused by variations in the gene sequence which codifies the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein.⁽¹⁾ This gene is located in the long arm of chromosome 7 (*locus* 7q31), and is divided in 27 exons, generating a protein composed of 1,480 amino acids.

The estimated prevalence in several countries is of 1 for every 2,800-3,500 live births.⁽²⁾ In Brazil, about 1 out of 10 thousand live births presents with the disorder.⁽³⁾ Mutations in CFTR establish a multisystemic aspect for

the disease, characterized by pulmonary, gastrointestinal and sweat gland disorders.⁽⁴⁾

Life expectancy in patients with CF has been improving, and, nowadays, more than half of them have reached adulthood.⁽²⁾ Such an improvement, among other factors, is owed to the increment in innovative treatments and the advancement of interdisciplinary care addressed to the patient with CF.⁽⁵⁾ Recently, specific therapies addressed to the CFTR channel, which are able to correct the basic flow, have been developed and approved for use in several countries. These targeted drugs aim at

ABSTRACT

Objectives: To characterize the main identified mutations on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in a group of children and adolescents at a cystic fibrosis center and its association with the clinical and laboratorial characteristics.

Method: Descriptive cross-sectional study including patients with cystic fibrosis who had two alleles identified with CFTR mutation. Clinical, anthropometrical, laboratorial and pulmonary function (spirometry) data were collected from patients' records in charts and described with the results of the sample genotyping. **Results:** 42 patients with cystic fibrosis were included in the study. The most frequent mutation was F508del, covering 60 alleles (71.4%). The second most common mutation was G542X (six alleles, 7.1%), followed by N1303K and R1162X mutations (both with four alleles each). Three patients (7.14%) presented type III and IV mutations, and 22 patients (52.38%) presented homozygous mutation for F508del. Thirty three patients (78.6%) suffered of pancreatic insufficiency, 26.2% presented meconium ileus, and 16.7%, nutritional deficit. Of the patients in the study, 59.52% would be potential candidates for the use of CFTR-modulating drugs. **Conclusions:** The mutations of CFTR identified more frequently were F508del and G542X. These are type II and I mutations, respectively. Along with type III, they present a more severe cystic fibrosis phenotype. More than half of the sample (52.38%) presented homozygous mutation for F508del, that is, patients who could be treated with Lumacaftor/Ivacaftor. Approximately 7% of the patients (7.14%) presented type III and IV mutations, therefore becoming candidates for the treatment with Ivacaftor.

Keywords: Cystic fibrosis; Mutations; Genetics; Phenotype; Child.

Corresponding address:

Leonardo Araújo Pinto. Centro Infantil, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6.690, 2º andar, Jardim Botânico, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: 55 51 3320-3000. E-mail: leonardo.pinto@pucrs.br
Financing: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

transforming CF therapy, making the prescription of drugs more accurate.⁽⁶⁾

Some protocols include genetic evaluation to complement neonatal screening and clinical diagnosis of CF, allowing the identification of patients who are eligible to mutation-specific therapies.⁽⁷⁾ The variants identified in CFTR are divided in six classes of mutations, based on their functional effects.⁽¹⁾ The relationship between genotype and the clinical consequences of all variants, however, requires further understanding.

This study aimed at reporting the main CFTR mutations identified in a group of children and adolescents followed-up at a multidisciplinary center for CF treatment in the South of Brazil, and at associating such mutations to specific clinical and laboratory characteristics.

METHOD

This is a cross-sectional, descriptive study. Patients who were followed-up at a reference center in the South of Brazil were included. The subjects with suggestive clinical history who were included had their diagnosis confirmed by laboratory examinations (sweat electrolyte test), and had the identification of two mutations in the CFTR. Figure 1 presents the flow chart of the inclusion of individuals in the study.

The reference center has multidisciplinary staff composed of physicians, nutritionists, physical therapists and psychologists, who regularly follow-up more than 100 patients (children and adults). The patients are periodically followed-up with clinical examinations (assessment of nutritional status and body mass index – BMI), laboratory examinations (albumin, glucose, liver function and stool elastase, according to indication) and spirometry (forced expiratory volume in 1 second – FEV1). Besides, the analysis of sputum culture or oropharyngeal swab is routine, in order to identify the colonization by *Pseudomonas aeruginosa* (PA). The molecular analysis of CFTR is carried out for all patients with clinical diagnosis (based on the symptoms and chloride in the sweat > 60), but without a definitive genetic diagnosis, in the following order: F508del genotype, kits for the study of mutations and sequencing; the investigation is interrupted when two alleles are identified.

The genotyping of the F508del mutation is the most frequent one in the population with CF, so it was presented in patients with clinical diagnosis. Heterozygotic individuals, or the ones who did not present with this mutation, carried out a panel of mutations with commercial kits of 32 to 97 mutations. In cases in which the genetic change had not been identified in both alleles, the complete sequencing of

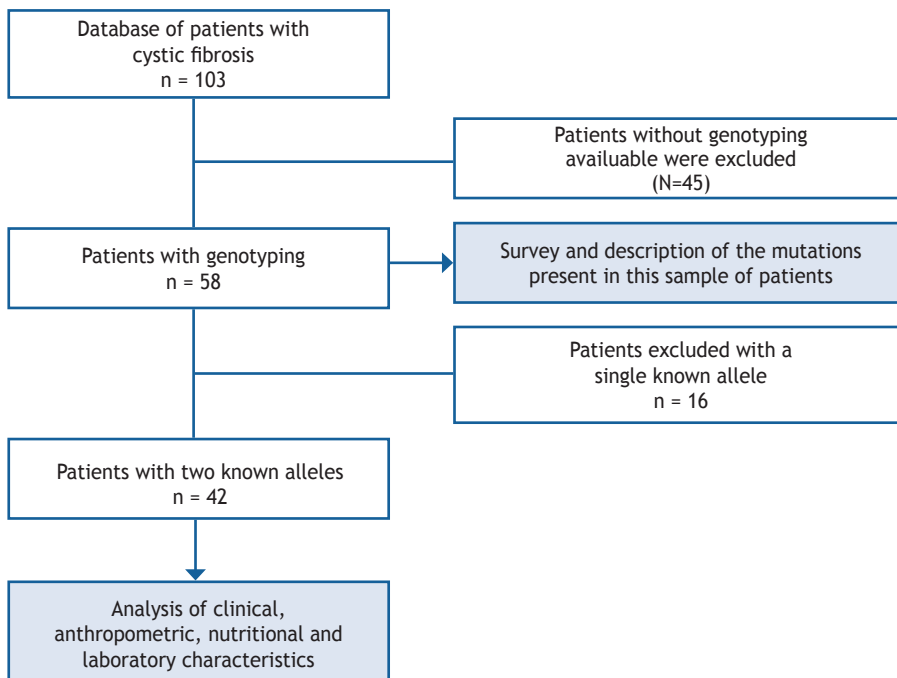


Figure 1. Flowchart of the inclusion of patients in the study.

the CFTR was performed. The analyses were conducted by different laboratories, according to the availability of the health system or private health insurance plan.

All of the collected data (age, immunoreactive trypsin dosage – IRT, chloride in the sweat, genotype, colonization, spirometry and clinical aspects) were obtained based on the information from the patients' charts. Simultaneously, a literature review was carried out regarding the phenotype described for the most frequent mutations found in our sample.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) and is registered by n. 49692115.7.0000.5336.

RESULTS

Of the 103 patients with CF followed-up at the multidisciplinary center, 58 (56.3%) have been genotyped. Of these, 42 (72.4%) were included in the study for presenting both known alleles of CFTR. Table 1 contains data referring to the sweat test and age of the patients, and Table 2 shows the clinical, nutritional, and pulmonary function characteristics according to the identification of the mutations in each one of the alleles. The most frequent mutation was class II, represented by F508del (p.Phe508del), present in 38 patients (90.48%), and comprehending 71.43% (60 alleles) of the total identified alleles. Among the patients who presented with alterations for p.Phe.508del, 57.89% were homozygous for the mutation. The second most common mutation was

class I, with mutation G542X (p.Gly542X), present in six alleles (7.14%), followed by the mutations N1303K (p.Asn1303Lys) and R1162X (p.Arg1162X), also class I, in four alleles (4.76%) each.

Of the 42 patients analyzed, 11 (26.2%) had meconium ileus, in which the following mutations were identified: F508del, G542X and R1162X. All of these represented mutation F508del, and seven patients (63.6%) were homozygous for this mutation. Three patients (27.3%) pointed mutation G542X as the second allele, and one patient showed mutation R1162X.

Regarding nutritional status, seven patients (16.7%) had deficit, characterized by BMI being below the lower limit of normal before or after the condition was diagnosed, and in these cases the following mutations were identified: F508del, R1162X e R347X; all of them contained mutation F508del. Of these, four were homozygous for F508del, two presented R1162X, and one, mutation R347X.

The patients were colonized by different types of bacteria: *Staphylococcus aureus* (SA), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Burkholderia cepacia* (BC), *Haemophilus influenzae* and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). The most common bacteria was SA, present in 28 of the 42 analyzed patients. PA was observed in 14 patients, all of whom presented the allele F508del; nine (64.3%) were homozygous for this mutation. BC was present in four patients, who had mutations F508del (3/8 alleles), R1162X (2/8 alleles) and N1303K, 711+5G>A, 1078delT.

Table 1. Mutations of the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), values of chloride in the sweat test (sweat Cl) and current age of patients with cystic fibrosis (CF).

Patients (n)	Allele 1	Mutation Class allele 1	Allele 2	Mutation Class allele 2	Sweat Cl (mEq/L)	Current Age (years)
22	F508del	II	F508del	II	86.51 ± 26.54	9.01 ± 7.20
5	F508del	II	G542X	I	84.66 ± 16.50	11.262 ± 7.3
3	F508del	II	N1303K	II	67.9 ± 0.00*	13.56 ± 3.66
3	F508del	II	R1162X	I	102 ± 19.09	6.66 ± 2.57
1	F508del	II	D1152H	IV	28	3.4
1	F508del	II	3272-26A>G	V	89	11.8
1	F508del	II	R347H	IV	88	2.11
1	F508del	II	G85E	II	76	9.7
1	F508del	II	R1066C	II	-	20
1	G542X	I	G551D	III	-	20.5
1	P205S	IV	3132delTG	I	92	13.1
1	N1303K	II	1078delT	I	79	7.6
1	711+5G>A	I	R1162X	I	-	17.1

Data presented in mean and standard deviation; *only 1/3 of the patients had these data collected.

Regarding pulmonary function, of the 22 patients who were homozygous for the change in class II p.Phe508del, 12 underwent spirometry, with FEV1 values ranging from 24 to 100% of the predicted value. The lowest values were observed in patients aged more than 18 years, showing reduction in pulmonary function with age. Of the three heterozygous patients for both mutations F508del/N1303K, one of them underwent spirometry with FEV1 value being 77%, and this patient was also colonized by SA. Of the five patients who were heterozygous for both mutations, three presented FEV1 ranging from 72 and 100%; they were all aged more than 15 years, one colonized by PA, and the other two, by SA. Of the two patients who were heterozygous for both mutations F508del/R1162X, FEV1 corresponded to 46 to 54%, in percentile, and these patients were aged between 5 and 10 years. In cases in which mutations only appeared once (F508del/3272-26A>G, F508del/G85E, F508del/R1066C, F508del/G551D, P205S/3132delTG, N1303K/1078delT, 711+5G>A/R1162X), FEV1 ranged from 43 to 104% of the predicted value.

DISCUSSION

Genotype-phenotype associations in CF, modifier genes, epigenetic factors, and environmental influence help to understand the broad spectrum of disease manifestations, which can range between single to multisystemic involvement, and between mild to severe disease.⁽⁸⁾

In this sample of patients with CF, F508del was the most common mutation, affecting more than 50% of the homozygous individuals. This class II mutation, responsible for the incorrect processing of the CFTR protein, present in approximately 70% of the Caucasian population with CF⁽⁹⁾, is considered as a severe mutation, showing the classic phenotype of the disease. Individuals who are homozygous for this mutation usually present with high sweat chloride test results (mean of 98 mEq/L), early signs of respiratory symptoms, reduced pulmonary function, pancreatic insufficiency and delayed growth⁽¹⁰⁾. It is the most known and studied mutation that causes CF.

Three other mutations were observed often in our sample: G542X, R1162X and N1303K. Mutation G542X (class I), characterized by a change that results in the absence of the CFTR protein, was the second most prevalent in this sample of patients (six alleles, 7.14%), and its frequency is estimated between 2.7 and 8.5% in Brazil.^(11,12) This mutation is responsible for the high incidence of meconium ileus.⁽¹³⁾ In our sample, most patients who presented with one allele of the mutation G542X also had pancreatic insufficiency (66.7%). A study that assessed clinical variables in 148 patients with this mutation verified that all of them had pancreatic insufficiency, which shows its severity.⁽¹⁴⁾ Patients with mutation R1162X (class I) presented high sweat chloride test results (mean of 103 mEq/L), mild to moderate pulmonary disease and pancreatic insufficiency. Class II mutation N1303K is

Table 2. Genotyping and clinical characteristics of the patients with cystic fibrosis.

n	Allele 1	Allele 2	MI	PI	BMI (percentile)	PA	FEV1 (% of the prediction)
22	F508del	F508del	31.82% (7)	77.3% (17)	47.27 ± 33.29	40.9% (9)	71.91 ± 25.48
5	F508del	G542X	60% (3)	60% (3)	58.2 ± 27.14	20% (1)	89 ± 19.31
3	F508del	N1303K	0	100% (3)	53 ± 39.23	33.33% (1)	77 ± 0.00*
3	F508del	R1162X	33.33% (1)	66.66% (2)	70.66 ± 28.99	33.33% (1)	50 ± 5.65
1	F508del	D1152H	no	no	26	no	-
1	F508del	3272-26A>G	no	yes	75	yes	73
1	F508del	R347H	no	yes	91	no	-
1	F508del	G85E	no	yes	99	no	104
1	F508del	R1066C	no	yes	92	yes	78
1	G542X	G551D	no	yes	40	no	82
1	P205S	3132delTG	no	yes	21	no	43
1	N1303K	1078delT	no	yes	51	no	29
1	711+5G>A	R1162X	no	yes	79	no	103

MI: meconium ileus; PI: pancreatic insufficiency with laboratory confirmation; BMI: body mass index; PA: colonization by *Pseudomonas aeruginosa*; FEV1: Forced expiratory volume in 1 second; *only 1/3 of the patients had this data collected 1/3.

Data presented in mean and standard deviation or percentage and absolute number.

among the most common ones⁽¹⁰⁾ for patients with CF, whose frequency is higher than 1%, and shows great variation between countries and ethnicities.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Considered as a severe mutation, its phenotype is related to severe pancreatic consequences, and may lead to pancreatic insufficiency and diabetes mellitus.^(15,16,18) Regarding pulmonary phenotype, the severity of the disease indicates great variability between the different mutations.^(15,18) In this sample, patients identified with mutation N1303K in one of the alleles had pancreatic insufficiency.

The other mutations that were found, being each of them presented in one patient, were revised next. Mutation 3132del TG (class I) is rare, and ongoing population studies⁽¹⁰⁾ will help to determine its disease phenotype. Mutation 711+5G>A (class I) is more common among Hispanic Americans and in Northeast Italy. A study that included two patients with this mutation associated with F508del showed that these patients had chronic colonization by PA and SA, liver disease and pancreatitis more often.⁽¹⁹⁾

The class III G551D mutation, which is related to the obstruction of the chloride passage through the CFTR protein channel, is associated with pulmonary disease, pancreatic insufficiency, infection by PA and sweat test with increased values. Of the 2,915 patients analyzed, with mean age of 20 years, with this mutation and another mutation for CF, pulmonary function, expressed by spirometry predicted values (FEV1%), in children aged less than 10 years, ranged from 73 to 128%, and between 10 and 20 years of age, from 49 to 121%. Ninety percent (n = 2,480) of the patients presented with pancreatic insufficiency, and 59%, with colonization by PA.⁽¹⁰⁾

Of the patients with CF, 0.7% have at least one copy of the G85E mutation (class II).^(20,21) Patients with genotype G85E/F508del are similar to the ones homozygous for F508del, when it comes to mean age of diagnosis, mean values of chloride in the sweat, weight/height ratio, spirometry (FEV1), and colonization by PA.⁽²²⁾

Mutation P205S (class IV, characterized by changes in the conduction of chloride through the CFTR protein channel) is associated with a mild phenotype of the disease, being characterized by pancreatic sufficiency^(10,23) and lack of gastrointestinal symptoms in most patients.⁽²³⁾ These present sweat chloride test with mean of 84 mEq/L. About 50% of the patients present colonization by PA or other pathogens,⁽¹⁰⁾ but, in general, demonstrate good evolution.

Mutation 3272-26A>G (class V, result of the insufficient amount of the normal CFTR protein present in the cellular surface) is associated with

the mild phenotype of the disease. Patients with one 3272-26A>G allele and another one in class I-III have less severe clinical manifestations (late diagnosis, better pulmonary function and lower incidence of PA) when compared to patients with two mutations of class I-III.^(24,25)

Mutation R347H (class IV) is related with pancreatic insufficiency and infection by PA. Of the 161 patients analyzed, with mean age of 23 years who have this mutation and another one for CF, pulmonary function, expressed by the spirometry predictive value (FEV1%), in children aged less than 10 years ranged from 95 to 139%; among individuals aged from 10 to 20 years, from 78 to 131%, and for those aged more than 20 years, from 34 to 107%.⁽¹⁰⁾

Mutation R1066C (class II) represents 5% of mutations for CF in Portugal, and 1% in Spain, places where a study assessed 28 patients with this mutation. It is a severe mutation, similar to that observed in patients homozygous for F508del.⁽²⁶⁾

The presence of mutation D1152H (class IV), combined with another mutation that causes CF, does not manifest the disease in all patients. Individuals who have this mutation associated with another one, which is known to cause CF, must undergo frequent check-up sessions, even if asymptomatic.⁽¹⁰⁾ Most chloride values in the sweat test is 45 mEq/L, and most patients have sufficient pancreas. Mean age at the time of diagnosis is 33 years. According to clinical studies, when it is concomitant to other mutations, D1152H usually causes pulmonary symptoms; however, these are not severe and associated with prolonged survival rates.⁽²⁷⁾ Mutation 1078delT (class I) can be phenotypically manifested by pancreatic insufficiency,⁽¹⁰⁾ and individuals who have it may present with cirrhosis and mild pulmonary disease.^(10,28,29)

Currently, the development of drugs which improve CFTR function have shown promising results in the course of the disease, and may be able to contribute with the increasing life expectancy in patients with CF. Two systemic modulators of CFTR were assessed in clinical trials involving patients with CF, and approved by the American agency Food and Drug Administration (FDA).

Ivacaftor (VX-770) is a drug that potentializes the CFTR regulator, increasing the ionic function in the cellular surface, improving the obstruction of airways due to the retention of water and increasing mucus purification. This drug can be used for patients who have one of the 33 mutations of classes III and IV — among them, mutations G551D, R347H and 1152H, present in three patients (7.14%) of this study.⁽³⁰⁻³³⁾

Lumacaftor (VX-809) is a CFTR corrector, which increases the amount of protein located in the surface of the cell; its effect is added to Ivacaftor, whose effect potentializes the chloride channels.⁽³³⁾ A study published in 2014, which included patients of 24 centers of cystic fibrosis in Australia, Belgium, Germany, New Zealand and the United States, showed that the association of Ivacaftor/Lumacaftor does not have significant effects for patients heterozygous for the class II mutation (p.Phe508del); however, patients who are homozygous for the mutation presented a reduction in the frequency of exacerbations and improvement of FEV1.⁽³⁴⁾

Recently, the FDA has approved the drug that combines Tezacaftor (VX-661) and Ivacaftor as therapy for patients with CF aged 12 years or more, who carry two copies of the F508del mutation, or for patients who are heterozygous for this mutation associated with a second mutation, which results in the residual function of CFTR. Tezacaftor helps the CFTR protein to dislocate

to the cellular surface, and then Ivacaftor helps the ionic CFTR channel to stay open for longer periods of time. Results of two phase 3 studies showed that the treatment with this medication has significantly improved pulmonary function and other health measures in comparison to placebo, showing a favorable safety profile. In our sample of patients, 27 (64.2%) of them would potentially benefit from this drug.

In conclusion, the mutations more often identified were F508del and G542X, which have higher severity profiles. In our sample, 22 patients (52.38%) would be potential candidates for the use of the compound Lumacaftor-Ivacaftor, which has proven to be effective in subjects aged more than 6 years homozygous for the F508del mutation. Besides, three patients (7.14%) would be candidates for the use of Ivacaftor, drug that can be used in individuals who present with 33 class III or IV mutations, such as G551D, R347H and 1152H, which were present in these patients.

REFERENCES

1. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2016;388(10059):2519-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6)
2. Spoonhower KA, Davis PB. Epidemiology of Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*. 2016;37(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.11.002>
3. Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Portal [Internet]. [acessado em abr. 2018]. Available from: <http://www.portalgbefc.org.br>
4. Egan ME. Genetics of Cystic Fibrosis: Clinical Implications. *Clin Chest Med*. 2016;37(1):9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.11.002>
5. Ikpa PT, Bijvelds MJ, de Jonge HR. Cystic fibrosis: toward personalized therapies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;52:192-200. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.008>
6. Mayer-Hamblett N, Boyle M, VanDevanter D. Advancing clinical development pathways for new CFTR modulators in cystic fibrosis. *Thorax*. 2016;71(5):454-61. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-208123>
7. Sosnay PR, Raraigh KS, Gibson RL. Molecular Genetics of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Genotype and Phenotype. *Pediatr Clin North Am*. 2016;63(4):585-98. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.04.002>
8. Brennan ML, Schrijver I. Cystic Fibrosis: A Review of Associated Phenotypes, Use of Molecular Diagnostic Approaches, Genetic Characteristics, Progress, and Dilemmas. *J Mol Diagn*. 2016;18(1):3-14. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.06.010>
9. Cystic Fibrosis Mutation Database. Portal [Internet]. [acessado em abr. 2018]. Available from: <http://www.genet.sickkids.on.ca/>
10. Clinical and Functional Translation of CFTR2. Portal [Internet]. [acessado em abr. 2018]. Available from: <https://www.cftr2.org/>
11. Araújo FG, Novaes FC, Santos NPC, Martins VC, Souza SM, Santos SEB, et al. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):11-5. <https://doi.org/S0100-879X2005000100003>
12. Coutinho CA, Marson FA, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2013;39(5):555-61. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132013000500005>
13. Dupuis A, Keenan K, Ooi CY, Dorfman R, Sontag MK, Naehrlich L, et al. Prevalence of meconium ileus marks the severity of mutations of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene. *Genet Med*. 2016;18(4):333-40. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.79>
14. Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1993;329(18):1308-13. <https://doi.org/10.1056/NEJM199310283291804>
15. Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dörk T, McIntosh I, et al. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet*. 1992;89(6):653-8.
16. Gonçalves LCS. Fibrose Cística: Estudo das Variações de Sequência do Gene CFTR na População Pediátrica Portuguesa [dissertação]. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2013.
17. Saraiva-Pereira ML, Fitarelli-Kiehle M, Sanseverino MTV. A Genética na Fibrose Cística. *Rev HCPA*. 2011;31(2):160-7.
18. Farhat R, Puisseuseau G, El-Seedy A, Pasquet MC, Adolphe C, Corbani S, et al. N1303K (c.3909C>G) Mutation and Splicing: Implication of Its c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] Complex Allele in CFTR Exon 7 Aberrant Splicing. *Biomed Res Int*. 2015;2015:138103. <https://doi.org/10.1155/2015/138103>
19. Rendine S, Calafell F, Cappello N, Gagliardini R, Caramia G, Rigillo N, et al. Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet*. 1997;61(Pt 5):411-24. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.1997.6150411.x>
20. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008;7(3):179-96. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009>
21. Chalkley G, Harris A. A cystic fibrosis patient who is homozygous for the G85E mutation has very mild disease. *J Med Genet*. 1991;28(12):875-7.
22. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. A Quick Guide to the G85E Mutation. Vertex Pharmaceuticals Incorporated; 2016.
23. Chillón M, Casals T, Nunes V, Giménez J, Pérez Ruiz E, Estivill X. Identification of a new missense mutation (P205S) in the first transmembrane domain of the CFTR gene associated with a mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mol Genet*. 1993;2(10):1741-2.
24. Amaral MD, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P, et al. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet*. 2001;38(11):777-83.

25. Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis T, Trager-Synodinos J, Kattamis C, Doudounakis S, et al. Mild cystic fibrosis phenotype in patients with the 3272-26A > G mutation. *J Med Genet.* 1995;32(5):406-7.
26. Liang MH, Wong LJ, Klein D, Shapiro B, Bowman CM, Hsu E, et al. Cystic fibrosis in a Puerto Rican female homozygous for the R1066C mutation. *J Med Genet.* 1998;35(1):84-5.
27. Burgel PR, Fajac I, Hubert D, Grenet D, Stremier N, Roussey M, et al. Non-classic cystic fibrosis associated with D1152H CFTR mutation. *Clin Genet.* 2010;77(4):355-64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01294.x>
28. Duguéperoux I, De Braekeleer M, Participating Centres to the French National Cystic Fibrosis Registry. Genotype-phenotype relationship for five CFTR mutations frequently identified in western France. *J Cyst Fibros.* 2004;3(4):259-63. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.07.004>
29. Moullier P, Jehanne M, Audrézet MP, Mercier B, Verlingue C, Quéré I, et al. Association of 1078 del T cystic fibrosis mutation with severe disease. *J Med Genet.* 1994;31(2):159-61.
30. Patel S, Sinha IP, Dwan K, Echevarria C, Schechter M, Southern KW. Potentiators (specific therapies for class III and IV mutations) for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;26(3):CD009841. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009841.pub2>
31. Simon RH, Sisson TH. Cystic fibrosis: Investigational therapies. *UpToDate.* 2017.
32. Athanazio RA, Silva Filho LVRF, Vergara AAV, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianny EFA, et al. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. *J Bras Pneumol.* 2017;43(3):219-45. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37562017000000065>
33. Wainwright CE, Elborn S, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med.* 2015;373(3):220-31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547>
34. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley Sa, Rowe SM, Rietschel E, et al. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2014;2(7):527-38. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70132-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70132-8)

ANEXO V

**Artigo publicado: False-negative newborn screening result for immunoreactive
trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease**



False-negative newborn screening result for immunoreactive trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease

Magali Santos Lumertz^{1,a}, Thaiane Rispoli^{2,b}, Katiana Murieli da Rosa^{3,c}, Leonardo Araújo Pinto^{3,4,d}

TO THE EDITOR:

For patients with cystic fibrosis (CF), specialized multidisciplinary care is important, as is early diagnosis to prevent or delay CF-related complications. Therefore, the CF newborn screening test for immunoreactive trypsinogen (IRT) is essential.⁽¹⁾ Because many patients are asymptomatic when the test is performed, prophylactic and therapeutic interventions can be implemented in a timely manner, and this increases their efficacy.^(2,3) However, false-positive and false-negative results can occur, the latter being less common than the former. Both are undesirable for screening and ideally should not occur. Factors associated with false-positive results are more commonly reported in the literature than are those associated with false-negative results; in addition, an increased number of follow-up studies have examined the potential psychosocial impact of false-positive results on children and their families, showing no persistent psychosocial harm despite immediate distress following notification of the positive result.⁽⁴⁾ False-negative results can occur in newborns with meconium ileus (MI), which is strongly associated with CF, as well as in those in whom a high cut-off point is used and in those in whom there is a delay between the date of birth and the date of dried blood spot (DBS) sample collection; in addition, false-negative results can be attributed to laboratory errors, including inefficient elution of DBS samples on filter paper.^(5,6)

At our multidisciplinary tertiary care center for CF we identified four patients whose IRT test results were interpreted as false negative because they were below the cut-off point used in the laboratory in which the tests were performed. The characteristics of the patients are summarized in Table 1. All four were male and White. Two had had MI at birth and therefore required a temporary ileostomy. Their IRT levels were 98.7 ng/mL (DBS samples having been collected in the first week of life) and 88.5 ng/mL (IRT testing having been performed at around the age of one month), the laboratory reference value being 110 ng/mL. The two patients underwent sweat testing and genotyping, a diagnosis of CF being established before neonatal discharge. A third patient underwent newborn screening at the age of 14 days. However, the IRT test for CF was not performed because it was not

part of the routine newborn screening panel performed in the state public health system at the time. Because of recurrent respiratory infections requiring hospitalization in the first year of life and because of subnormal weight and height at around the age of six months, the attending physician requested an expanded newborn screening panel including IRT testing, the results of which were reported as normal. Intestinal obstruction requiring laparotomy, together with the aforementioned clinical changes, again raised the suspicion of CF. The patient underwent sweat testing, which confirmed the diagnosis of CF, specialized outpatient treatment being initiated. In addition to having been colonized with *Staphylococcus aureus*, the patient had positive cultures for *Pseudomonas aeruginosa*, which became negative after *P. aeruginosa* eradication therapy. A fourth patient underwent newborn screening at the age of six days, his IRT level being 39.4 ng/mL (laboratory reference value, 110 ng/mL). Because of growth deficit, as well as recurrent steatorrhea, cough, and wheezing, the patient underwent sweat testing (at the age of three years), his sweat chloride level being 118 mmol/L in a 231-g sample.

In countries where CF newborn screening is performed,⁽⁷⁾ different protocols are used, all of which have advantages and disadvantages. In Brazil, in the states in which CF newborn screening is routinely performed, a diagnostic test (usually a sweat test) is performed in patients whose IRT levels are measured twice and found to be elevated on both measurements (the IRT/IRT protocol). In the state of Rio Grande do Sul, IRT measurement was officially added to the routine newborn screening panel in June of 2012. In developed countries, CF newborn screening protocols include genetic testing for common mutations in the *CFTR* gene, which encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein, and *CFTR* gene sequencing (the IRT/DNA protocol).⁽⁸⁾ In a study conducted in France, the IRT/DNA protocol and the IRT/pancreatitis-associated protein protocol were compared in terms of their performance in CF newborn screening, the latter being found to be not inferior to the former in screening for CF.⁽⁹⁾

Although the CF newborn screening test for IRT identifies 95-99% of newborns with CF (depending on the screening protocol used), false-negative results can

1. Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.
3. Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.
4. Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.
a. <http://orcid.org/0000-0001-9282-272X>; b. <http://orcid.org/0000-0003-4421-8995>; c. <http://orcid.org/0000-0001-7120-3022>;
d. <http://orcid.org/0000-0002-3906-5456>

Table 1. Patient characteristics.

Case	IRT level/ RV (ng/ mL)*	Sweat chloride concentration (mmol/L)	Genotype	Meconium ileus	Low weight gain prior to diagnosis	Recurrent respiratory infections	Use of pancreatic enzymes	Airway bacterial colonization
1	98.7/110	85	F508del/ R1162X	X			X	MRSA
2	88.5/110	54	F508del/ F508del	X			X	SA
3	^a	111	F508del/ R1162X		X	X	X	SA
4	39.4/110	118	F508del/ F508del		X	X	X	SA

IRT: immunoreactive trypsinogen; RV: reference value; MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; and SA: *Staphylococcus aureus*. *Reported as normal, with no data on the actual level of IRT.

delay diagnosis, particularly when IRT levels are within the normal range and the clinical signs of the disease are overlooked.⁽¹⁰⁾ It should be borne in mind that IRT measurement is not a diagnostic test.⁽⁵⁾ Therefore, regardless of serum IRT levels, sweat testing should be performed in all patients clinically suspected of having CF, including those with a negative IRT level and MI, as well as those whose parents have CF-associated mutations.⁽¹⁰⁾ Factors associated with false-negative results were identified in three of the four patients in the present study: two had had MI at birth, which raised the suspicion of CF and led to further diagnostic testing; and one underwent IRT testing at around the age of six months, by which time clinical symptoms had appeared, leading to misinterpretation of the results and delayed diagnosis. In the remaining patient (whose IRT level was 39.4 ng/mL), no false-negative-associated factors were identified.

One group of authors described cases of false-negative newborn screening results despite the use of *CFTR* gene analysis as a screening strategy.⁽⁵⁾ In a study evaluating the newborn screening program in the state of Paraná, Brazil, 30 months after its implementation,⁽¹¹⁾ only one case of a false-negative newborn screening result was found. In a study involving two centers for CF newborn screening in the state of São Paulo, Brazil, no false-negative results were found over a period of nearly two years.⁽¹²⁾

Because CF newborn screening allows timely implementation of therapeutic interventions, a diagnosis of CF should not be based on serum IRT levels alone. Regardless of their serum IRT levels, patients presenting with clinical signs and symptoms suggestive of CF, as well as those with MI at birth and those with CF siblings, should undergo sweat testing, *CFTR* gene sequencing, or both.

REFERENCES

- Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1979;1(8114):472-4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(79\)90825-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(79)90825-0)
- Stocks J, Thia LP, Sonnappa S. Evaluation and use of childhood lung function tests in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(6):602-8. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328358dfbe>
- Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*. 2001;107(1):1-13. <https://doi.org/10.1542/peds.107.1.1>
- Hayeems RZ, Miller FA, Barg CJ, Bombard Y, Kerr E, Tam K, et al. Parent Experience With False-Positive Newborn Screening Results for Cystic Fibrosis. *Pediatrics*. 2016;138(3): pii: e20161052. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-1052>
- Dunn CT, Skrypek MM, Powers AL, Laguna TA. The need for vigilance: the case of a false-negative newborn screen for cystic fibrosis. *Pediatrics*. 2011;128(2):e446-9. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-0286>
- Kloosterboer M, Hoffman G, Rock M, Gershan W, Laxova A, Li Z, et al. Clarification of laboratory and clinical variables that influence cystic fibrosis newborn screening with initial analysis of immunoreactive trypsinogen. *Pediatrics*. 2009;123(2):e338-46. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1681>
- Southern KW. Determining the optimal newborn screening protocol for cystic fibrosis. *Thorax*. 2012;67(4):281-2. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201589>
- Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2007;6(1):57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.05.008>
- Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn JC, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. *J Cyst Fibros*. 2014;13(4):384-90. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.01.004>
- Comeau AM, Accurso FJ, White TB, Campbell PW 3rd, Hoffman G, Parad RB, et al. Guidelines for implementation of cystic fibrosis newborn screening programs: Cystic Fibrosis Foundation workshop report. *Pediatrics*. 2007;119(2):e495-518. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1993>
- Santos GP, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Neonatal cystic fibrosis screening program in the state of Paraná: evaluation 30 months after implementation [Article in Portuguese]. *J Pediatr (Rio J)*. 2005;81(3):240-4. <https://doi.org/10.2223/JPED.1345>
- Rodrigues R, Magalhaes PK, Fernandes MI, Gabetta CS, Ribeiro AF, Pedro KP, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(10):973-8. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000017>

Curriculum *Vitae* resumido

RISPOLI, T.

Dados Pessoais

Nome: Thaiane Rispoli Serrano

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

Email: thaianerispoli@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2016-2020** Doutorado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES7)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Fibrose cística: nova abordagem molecular para diagnóstico, e estudos *in silico* para melhor compreensão da doença.
Orientador: Maria Lucia Rosa Rossetti
Coorientador: José Eduardo Vargas Muñoz
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2014-2016** Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES7)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Detecção de mutações no gene CFTR em pacientes com suspeita de Fibrose Cística
Orientador: Maria Lucia Rosa Rossetti
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2010-2014** Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 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, FAPERGS, Brasil.

Formação Complementar

- 2019 - 2019** Extensão universitária em Bioinformática: Ênfase em Dinâmica Molecular.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
- 2019 - 2019** Curso de Excel Intermediário.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2019 - 2019** Treinamento Operacional e em Aplicações - 3500 *Genetic Analyzer*.
Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil.

- 2019 - 2019** Next Generation Sequencing para Medicina Genômica. Teoria e Prática.
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- 2010 - 2016** Curso completo de Inglês.
Associação Comunitária de Ensino de Línguas Estrangeiras, ACELE, Brasil.
- 2014 – 2014** Curso de Estatística Aplicada a Laboratórios.
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.
- 2014 – 2014** Introduction to Transcriptional Network Analysis.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2014 – 2014** Bioinformática Aplicada ao Sequenciamento.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2013 – 2013** Extensão universitária em Método Lógico para Redação Científica Internacional.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
- 2013 – 2013** Estágio Curricular.
Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.
- 2012 – 2012** Técnicas de Espalhamento de Luz.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Atuação Profissional

1. Organização Mundial da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, OMS, OPAS, Brasil.

- 2020 – 2020** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Cientista, Carga horária: 30
Apoio técnico-científico na Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul com foco no fortalecimento das ações de laboratório, visando o enfrentamento da pandemia de COVID-19 no nível estadual e municipal.

2. Universidade Comunitária da Região de Chapecó, UNOCHAPECÓ, Brasil.

- 2020 – 2020** Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Corpo Docente, Carga horária total: 12
- 2019 – 2019** Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Docente da Pós-Graduação Lato Sensu em Análises Clínicas e Moleculares, Carga horária total: 36

3. Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.

- 2017 – 2017** Vínculo: Professor convidado, Enquadramento funcional: Docente, Carga horária total: 30
- 2016 – 2016** Vínculo: Professor convidado, Enquadramento funcional: Docente, Carga horária total: 21

4. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.

- 2013 – 2013** Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento Funcional: Estagiária, nível superior, Carga horária total: 360
Estudo da diversidade genética viral e humana na modulação da resposta imune durante a infecção pelo HIV.

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

- 2016 – 2020** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutoranda
- 2014 – 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 40
- 2014 – 2016** Vínculo: Monitora de disciplina, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 60, Regime: dedicação exclusiva

2011 – 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário de Iniciação Científica,
Carga horária: 20

Prêmios e Títulos

2019 Melhor Pôster Simples - 3ºLugar, VII Congresso Brasileiro Multidisciplinar de Fibrose Cística.

2018 Melhor Tema Livre Apresentado - Apresentação Oral, VII Congresso Brasileiro da SBTEIM, XXX Congresso Brasileiro Genética Médica.

2017 Melhor Pôster Simples - 1º Lugar, VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística.

Artigos Completos Publicados em Periódicos

1. **RISPOLI, THAIANE**; RODRIGUES, GRAZIELLE M. ; DE CASTRO, SIMONE M. ; PRADO, MAYARA J. ; DA SILVA, CLÁUDIA M. D. ; GRANDI, TARCIANA ; FISCHER, GILBERTO B. ; PINTO, LEONARDO A. ; MARÓSTICA, PAULO J. C. ; SCORTEGAGNA, LAÍS C. R. ; MOCELIN, HELENA T. ; VARGAS, JOSÉ EDUARDO ; ROSSETTI, MARIA L. R. . Cystic Fibrosis: A Simple and Customized Strategy for Genetic Screening Able to Detect Over 90% of Identified Mutated Alleles in Brazilian Newborns. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 24, p. 315-325, 2020.
2. **RISPOLI, THAIANE**; RODRIGUES, GRAZIELLE MOTTA ; PRADO, MAYARA JORGENS ; PINTO, LEONARDO ARAÚJO ; RODRIGUES, MARCELO TADDAY ; DULLIUS, CYNTHIA ROCHA ; GRANDI, TARCIANA ; DA SILVA, CLÁUDIA MARIA DORNELLES ; VARGAS, JOSÉ EDUARDO ; RIGO, MAURÍCIO MENEGATTI ; ROSSETTI, MARIA LUCIA . Novel frameshift variant of the *CFTR* gene: S511Lfs*2 from phenotype to molecular predictions. *Molecular Biology Reports*, v. 47, p. 6463-6469, 2020.
3. LUMERTZ, MAGALI SANTOS ; **RISPOLI, THAIANE** ; ROSA, KATIANA MURIELI DA ; PINTO, LEONARDO ARAÚJO . False-negative newborn screening result for immunoreactive trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* , v. 45, p. e20180062, 2019.
4. ROSA, K. M. ; LIMA, E. S. ; MACHADO, C. C. ; **RISPOLI, T.** ; SILVEIRA, V. D. ; ONGARATTO, R. ; COMARU, T. ; PINTO, L. A. . Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with cystic fibrosis in Southern Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia (Online)*, v. 44, p. 498-504, 2018.
5. **RISPOLI, THAIANE**; MARTINS DE CASTRO, SIMONE ; GRANDI, TARCIANA ; PRADO, MAYARA ; FILIPPON, LETÍCIA ; DORNELLES DA SILVA, CLÁUDIA MARIA ; VARGAS, JOSÉ EDUARDO ; ROSSETTI, LUCIA MARIA ROSA . A Low-Cost and Simple Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System. *Journal of Pediatrics*, v. 18, p. 30419-0, 2018. Citações:2
6. PRADO, MAYARA JORGENS ; DE CASTRO, SIMONE MARTINS ; KOPACEK, CRISTIANE ; DE MELLO, MARICILDA PALANDI ; **RISPOLI, THAIANE** ; GRANDI,

- TARCIANA ; DA SILVA, CLÁUDIA MARIA DORNELLES ; ROSSETTI, MARIA LUCIA ROSA . Development of *CYP21A2* Genotyping Assay for the Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 21, p. 663-675, 2017.
7. MOCELIN, H. T.; FISCHER, G. B. ; CASTRO, S. M. ; GRANDI, T. ; CHAPPER, M. ; **RISPOLI, T.** ; SANSEVERINO, P. B. . Cystic fibrosis neonatal screening in the Unified Health System in Rio Grande do Sul. *Boletim científico de pediatria*, v. 06, p. 3-8, 2017.
 8. 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, THAIANE 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:27|6

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. CASTRO, S. M. ; MOCELIN, H. T. ; RODRIGUES, G. ; GRANDI, T. ; DORNELLES, C. M. ; CHAPPER, M. ; **RISPOLI, T.** . Fibrose Cística: apresentação das principais mutações identificadas pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do Rio Grande do Sul. In: XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica; VII Brasileiro da SBTEIM, 2018, Rio de Janeiro.
2. PRADO, MAYARA JORGENS ; DORNELLES, C. M. ; KOPACEK, C. ; CASTRO, S. M. ; WIEST, P. ; **RISPOLI, T.** ; PONCE, B. ; GRANDI, T. ; ZAHA, A. ; ROSSETTI, M.L.R. Congenital Adrenal Hyperplasia: genetic analysis of children that had borderline elevation of 17OH in the newborn screening. In: International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. 2018 International Congress of Genetics, 2018.
3. GRANDI, T. ; DORNELLES, C. M. ; **RISPOLI, T.** ; PRADO, MAYARA JORGENS; RODRIGUES, G. ; PONCE, B. ; CASTRO, S. M. ; ROSSETTI, M.L.R. Application of Molecular Diagnosis of Hemoglobin Disorders in the Public Health System in Southern Brazil. In: International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. 2018 International Congress of Genetics, 2018.
4. AIRES, G. P. ; CASTRO, S. M. ; RODRIGUES, G. ; FISCHER, G. B. ; MOCELIN, H. T. ; PINTO, L. A. ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; ROSSETTI, M.L.R. ; **RISPOLI, T.** . Frequency Description of the IVS8-(TG)m(T)n Polymorphism of the *CFTR* Gene in Patients from Three Reference Centers in Cystic Fibrosis of the Southern Brazil. In: International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. 2018 International Congress of Genetics, 2018.
5. RODRIGUES, G. ; CASTRO, S. M. ; MOCELIN, H. T. ; AIRES, G. P. ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; ROSSETTI, M.L.R. ; **RISPOLI, T.** . Genotypic and phenotypic

- description of cystic fibrosis newborns screened by the Neonatal Screening Reference Service of the Southern Brazil. In: International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. 2018 International Congress of Genetics, 2018.
6. **RISPOLI, T.**; CASTRO, S. M. ; RODRIGUES, G. ; AIRES, G. P. ; PRADO, MAYARA ; MOCELIN, H. T. ; CHAPPER, M. ; GRANDI, T. ; DORNELLES, C. M. ; VARGAS, JOSÉ EDUARDO ; Rossetti, Maria Lucia Rosa . Genetic Screening for Cystic Fibrosis Provided by the Brazilian Public Health System: SNaPshot Panel of Eleven Variants and the Main Mutations Found. In: International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. 2018 International Congress of Genetics, 2018.
 7. **RISPOLI, T** ; PRADO, M.J. ; CASTRO, S. M. ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; ROSSETTI, M.L.R. Detecção de mutações no gene *CFTR* em pacientes com suspeita de Fibrose Cística. In: VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017, Curitiba- PR. Resumos - VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017.
 8. CASTRO, S. M. ; **RISPOLI, T.** ; PRADO, M.J. ; GRANDI, T. ; DORNELLES, C. M. ; RODRIGUES, G. ; MOCELIN, H. T. ; FISCHER, G. B. ; CHAPPER, M. ; MACEDO, J. ; KOPACEK, C. . Molecular Biology Laboratory as an Important Support in the Final Diagnosis of the Diseases Triaged in Newborn Screening in Southern Brazil. In: 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017, Rio de Janeiro. 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017.
 9. CASTRO, S. M. ; MOCELIN, H. T. ; FISCHER, G. B. ; DORNELLES, C. M. ; RODRIGUES, G. ; GRANDI, T. ; CHAPPER, M. ; **RISPOLI, T.** . Challenges in Neonatal Diagnosis of Cystic Fibrosis: 4 years of experience in Southern Brazil. In: 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017, Rio de Janeiro. 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017.
 10. PRADO, M.J. ; DORNELLES, C. M. ; KOPACEK, CRISTIANE ; CASTRO, S. M. ; DE MELLO, MARICILDA PALANDI ; **RISPOLI, T.** ; GRANDI, T. ; ROSSETTI, M.L.R.. Congenital Adrenal Hyperplasia: Mutation Detection of *CYP21A2* gene in Cases from Southern Brazil. In: 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017, Rio de Janeiro. 13th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, 2017.
 11. LIMA, E. S. ; CAMARGO, S. S. ; BOTEGA, R. ; SILVA, R. C. ; ACCORSI, B. F. ; WEBER, K. B. ; **RISPOLI, T.** ; ROSA, K. M. ; LUMERTZ, M. S. ; PINTO, L. A. . IRT falso-negativo no teste de triagem neonatal: um problema a ser considerado em crianças com doença pulmonar crônica e insuficiência pancreática. In: X Congresso Gaúcho de Atualização em Pediatria/ VIII Simpósio Sul-Americano de Pediatria /Encontro Anual da SPRS, 2017, Porto Alegre. X Congresso Gaúcho de Atualização em Pediatria/ VIII Simpósio Sul-Americano de Pediatria /Encontro Anual da SPRS, 2017.
 12. CASTRO, S. M. ; **RISPOLI, T.** ; CHAPPER, M. ; MOCELIN, H. T. ; FISCHER, G. B. ; GRANDI, T. . Triagem neonatal para fibrose cística: 4 anos de experiência no estado do RS.

- In: VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017, Curitiba. VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017.
13. LUMERTZ, M. S. ; **RISPOLI, T.** ; ROSA, K. M. ; PINTO, L. A. . IRT falso-negativo no teste de triagem neonatal: um problema a ser considerado em crianças com doença pulmonar crônica e insuficiência pancreática. In: VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017, Curitiba. VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017.
 14. **RISPOLI, T.**; PRADO, M.J. ; CASTRO, S. M. ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; ROSSETTI, M.L.R. . Detecção de Mutações no gene *CFTR* em Pacientes com Suspeita de Fibrose Cística. In: VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017, Curitiba. VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017.
 15. RODRIGUES, G. ; **RISPOLI, T.** ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; CASTRO, S. M. . Identificação da região polimórfica IVS8-(TG)_m(T)_n e relação com os níveis de IRT e íons cloro no suor em recém-nascidos triados pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) do estado do Rio Grande do Sul. In: VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017. VI Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2017.
 16. CASTRO, S. M. ; CHAPPER, M. ; MALERBA, H. ; FISCHER, G. B. ; DORNELLES, C. M. ; **RISPOLI, T.** ; GRANDI, T. ; FILIPPON, L. . 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, 2015, Gramado / RS. V Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2015.
 17. **RISPOLI, T.**; FILIPPON, L. ; CHAPPER, M. ; MALERBA, H. ; FISCHER, G. B. ; DORNELLES, C. M. ; GRANDI, T. ; CASTRO, S. M. . Determinação da mutação F508del em pacientes sob investigação de fibrose e que foram a óbito. In: V Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2015, Gramado / RS. V Congresso Brasileiro de Fibrose Cística, 2015.
 18. CASTRO, S. M. ; **RISPOLI, T.** ; DORNELLES, C. M. ; CHAPPER, M. ; FISCHER, G. B. ; MALERBA, H. ; FILIPPON, L. . Study of three years of newborn screening for cystic fibrosis in the public health system in southern Brazil. In: X Congresso Latino Americano de Erros Inatos do Metabolismo e Pesquisa Neonatal, 2015, Santiago- Chile. X Congresso Latino Americano de Erros Inatos do Metabolismo e Pesquisa Neonatal, 2015.
 19. **RISPOLI, T.** ; SCHRANK, A. Estudo funcional da quitinase ChiMaA4 no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. In: XXV Salão de iniciação científica da UFRGS, 2013, Porto Alegre. Resumos do XXV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2013.
 20. **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.

21. 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.
22. **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.
23. 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.
24. **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.
25. **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.
26. **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