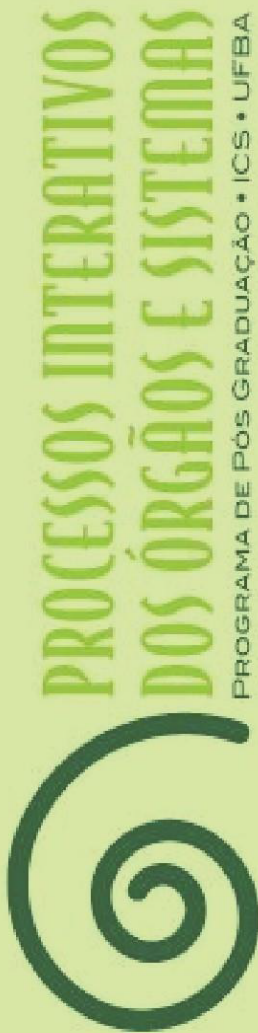


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

ADSON SANTANA DE JESUS

ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIANTES NOS
GENES *SERPINA1*, *SLC6A14* E *SLC26A9*
E A FIBROSE CÍSTICA



Salvador
2022



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

ADSON SANTANA DE JESUS

**ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIANTES NOS GENES *SERPINA1*,
SLC6A14 E *SLC26A9* E A FIBROSE CÍSTICA**

Salvador
2022

ADSON SANTANA DE JESUS

**ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIANTES NOS GENES *SERPINA1*, *SLC6A14* E *SLC26A9*
E A FIBROSE CÍSTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Lúcia Santos Souza.

Salvador

2022

Este estudo contou com o apoio de Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), por meio de concessão de bolsa.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

J58a Jesus, Adson Santana de.
Associações entre variantes nos genes SERPINA1, SLC6A14 e SLC26A9 e a fibrose cística. / Adson Santana de Jesus – Salvador, 2023.
67 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Lúcia Santos Souza
Dissertação (Mestrado) – PPGPIOS/UFBA

1. Mucoviscidose. 2. Variabilidade fenotípica. 3. SERPINA1. 4. SLC6A14. 5. SLC26A9. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Souza, Edna Lúcia Santos. III. Título.

CDU 616.2(043)

Antônio José Menezes de Castro Neves – Bibliotecário CRB-5/1821



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

ADSON SANTANA DE JESUS

**ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIANTES NOS GENES SERPINA1, SLC6A14 E SLC26A9 E
A FIBROSE CÍSTICA**

Salvador, Bahia, 21 de outubro de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:
Edna Lucia Santos de Souza

PROFA. DRA. EDNA LUCIA SANTOS DE SOUZA (Examinadora Interna)

DocuSigned by:
Renata Lucia Leite Ferreira de Lima

PROFA. DRA. RENATA LUCIA LEITE FERREIRA DE LIMA (Examinadora Interna)

DocuSigned by:
Fernando Augusto de Lima Marson

PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON (Examinador Externo)

Dedico à minha vó Francisca, que cuidou de mim como um filho desde o momento do meu nascimento e foi o alicerce da minha jornada até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, incluindo a coordenação, o corpo docente e o colegiado. Ser discente do PPGPIOS foi muito enriquecedor para o meu caminho técnico-científico.

Ao Laboratório de Genética Humana e Mutagênese, pela aprendizagem técnico-científica e pelas maravilhosas comilanças nas datas comemorativas. Gostaria de agradecer especialmente a Laís Ribeiro e a Mônica Jacobina, por me guiarem nos meus primeiros passos dentro do laboratório.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular e aos docentes Camila Figueiredo e Ryan dos Santos Costa, pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

Ao meu amigo, Hatilla Santos, pela ajuda imensurável na genotipagem das amostras e nas análises dos genótipos. As reuniões online e os cafezinhos de fim de tarde no pátio do ICS aliviaram bastante a aflição da espera pelos resultados.

À equipe do ambulatório de Fibrose Cística do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e ao grupo científico da Professora Edna Lúcia, por me acolherem durante o desenvolvimento do mestrado.

Às docentes Edna Lúcia Souza e Renata Lima, pelos ensinamentos, orientação, atenção e paciência. Vocês demonstram que a competência profissional não pode ser dissociada do tratamento acolhedor e humano.

Aos meus amigos, pelos encontros e momentos maravilhosos e pelo suporte nos momentos mais desafiadores.

Às minhas irmãs, Ellen Santana e Amanda Santana, aos meus primos e às minhas primas, pelo carinho e pelos momentos de alegria.

À minha afilhada, Júlia Santana, por suavizar os meus dias.

À minha mãe, Mércia Matos, e às minhas tias, Marli Matos, Mônica Matos, Márcia Matos, Maria da Conceição e Joelice Medeiros, que foram essenciais em todas as etapas da minha vida.

À minha avó, Francisca Maria, por me amar como um filho e construir a base que me permitiu chegar até aqui.

JESUS, Adson Santana de. **Associações entre variantes nos genes *SERPINA1*, *SLC6A14* e *SLC26A9* e a fibrose cística**. 2022. Orientador: Edna Lúcia Santos Souza. 67 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador).

RESUMO

Introdução: A fibrose cística é uma doença autossômica recessiva, multissistêmica e potencialmente letal, com maior incidência em populações de origem caucasiana. A sua etiologia é caracterizada pela presença de variantes patogênicas no gene *CFTR*, o qual codifica uma proteína homônima. Ela apresenta grande heterogeneidade na frequência e na complexidade das suas manifestações clínicas e os genes modificadores são descritos como um dos fatores que regulam este fenômeno. **Objetivo:** Estabelecer a frequência de variantes alélicas nos genes *SERPINA1*, *SLC6A14* e *SLC26A9* e analisar a sua influência na heterogeneidade das manifestações clínicas de indivíduos acometidos pela doença. **Materiais e Métodos:** Trata-se de um estudo de corte transversal. As amostras de *DNA* genômico de 56 indivíduos foram submetidas à técnica da PCR em tempo real (qPCR) para a identificação dos genótipos das variantes rs28929474 (*SERPINA1*), rs3788766 (*SLC6A14*) e rs7512462 (*SLC26A9*). As plataformas *Gene-Calc*, *dbSNP (NCBI)*, *RegulomeDB 2.0.3* e *HaploReg 4.1* foram consultadas para a determinação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e para a obtenção de dados genéticos e funcionais sobre as variantes analisadas. A associação entre as variantes e as variáveis clínicas relacionadas à fibrose cística foi determinada por uma regressão logística binomial realizada no software *RStudio 2022.07.0*, na qual quatro modelos genéticos foram considerados: alélico, dominante, recessivo e aditivo. **Resultados:** Os alelos de menores frequências para as variantes rs3788766 e rs7512462 foram o A (0,41) e C (0,4), respectivamente. Todos os alelos da variante rs28929474 foram representados pelo nucleotídeo C. A variante rs3788766 foi associada significativamente ao uso de dornase alfa nos modelos recessivo (OR = 0,23; p = 0,04) e aditivo (OR = 0,23; p = 0,04), à ocorrência de exacerbação pulmonar no modelo dominante (OR = 9,09; p = 0,04), ao risco nutricional para sobrepeso nos modelos alélico (OR = 4,48; p = 0,03) recessivo (OR = 16,03; p = 0,02) e aditivo (OR = 19,73; p = 0,03), e ao risco nutricional para desnutrição nos modelos alélico (OR = 0,22; p = 0,03), recessivo (OR = 0,06; p = 0,02) e aditivo (OR = 0,05; p = 0,03). Não foram observadas associações significativas para a variante rs7512462. **Conclusões:** Os alelos A e C relacionados às variantes rs3788766 e rs7512462, respectivamente, foram frequentes entre os sujeitos incluídos no estudo. A variante rs3788766 foi associada aos marcadores da doença pulmonar (uso de dornase alfa e episódios de exacerbação pulmonar) e, principalmente, ao risco nutricional para sobrepeso e desnutrição.

Palavras-chave: mucoviscidose; variabilidade fenotípica; *SERPINA1*; *SLC6A14*; *SLC26A9*.

JESUS, Adson Santana de. **Associations between variants in *SERPINA1*, *SLC6A14* e *SLC26A9* genes and cystic fibrosis**. 2022. Advisor: Edna Lúcia Santos Souza. 67 s. il. Dissertation (Master in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive, multisystemic and potentially lethal disease, which incidence is higher in Caucasian population. CF aetiology is characterized by the presence of pathogenic variants in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) gene, which encodes a homonymous protein. CF heterogeneity is high in frequency and complexity of its clinical manifestations and modifier genes are described as one of the factors that regulates the phenomenon. **Objective:** To establish the frequency of allelic variants in *SERPINA1*, *SLC6A14* and *SLC26A9* genes and to analyze their influence on the heterogeneity of clinical manifestations in individuals with CF. **Materials and Methods:** The study is cross-sectional. Genomic DNA samples from 56 individuals were subjected to real-time PCR (qPCR) technique in order to identify the genotypes of rs28929474 (*SERPINA1*), rs3788766 (*SLC6A14*) and rs7512462 (*SLC26A9*) variants. The Gene-Calc, dbSNP (NCBI), RegulomeDB 2.0.3 and HaploReg 4.1 platforms were consulted for determining the Hardy-Weinberg Equilibrium and obtaining genetic and functional data on the analyzed variants. The association between variants and CF-related clinical variables was determined by binomial logistic regression which was performed in RStudio 2022.07.0 software, in which four genetic models were considered: allelic, dominant, recessive and additive. **Results:** The minor alleles frequencies (MAF) for the rs3788766 and rs7512462 variants were A (0.41) and C (0.4), respectively. All of the alleles in rs28929474 variant were represented by nucleotide C. The rs3788766 variant was significantly associated with dornase alfa use in the recessive (OR = 0.23; p = 0.04) and additive (OR = 0.23; p = 0.04) models, occurrence of pulmonary exacerbations in dominant model (OR = 9.09; p = 0.04), nutritional risk of overweight in the allelic (OR = 4.48; p = 0.03), recessive (OR = 16.03; p = 0.02), and additive (OR = 19.73; p = 0.03) models, and nutritional risk of malnutrition in the allelic (OR = 0.22; p = 0.03), recessive (OR = 0.06; p = 0.02), and additive (OR = 0.05; p = 0.03) models. No significant associations were observed for the rs7512462 variant. **Conclusions:** The A and C alleles related to rs3788766 and rs7512462 variants, respectively, were frequent among the people in the study. The rs3788766 variant was associated with markers of lung disease (use of dornase alfa and episodes of lung exacerbations) and, especially, nutritional risk of overweight and malnutrition.

Keywords: mucoviscidosis; phenotypic variability; *SERPINA1*, *SLC6A14*, *SLC26A9*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da população de acordo com as variáveis estudadas (N=56)	33
Tabela 2	Descrição genética e funcional das variantes estudadas	34
Tabela 3	Associações entre a variante rs3788766 (<i>SLC6A14</i>) e variáveis clínicas da FC	35
Tabela 4	Associações entre a variante rs7512462 (<i>SLC26A9</i>) e variáveis clínicas da FC	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Alfa-1 antitripsina
ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
AIFC	Ambulatório Interdisciplinar de Fibrose Cística
ASL	<i>Airway surface liquid</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFPAC-1	<i>Cystic Fibrosis Pancreatic Adenocarcinoma Cell Line</i>
Cl ⁻	Íon cloreto
DAAT	Deficiência de alfa-1 antitripsina
DHRFC	Doença hepática relacionada à Fibrose Cística
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRFC	Diabetes relacionada à fibrose cística
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
GWAS	<i>Genomic-wide association studies</i>
HCO ₃ ⁻	Íon de bicarbonato
HEK 293	<i>Human embryonic kidney 293 cells</i>
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
IPE	Insuficiência pancreática exócrina
IRT	Tripsina imunorreativa
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNA
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
Na ⁺	Íon de sódio

OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
<i>PANC-1</i>	<i>Human pancreatic carcinoma cell line</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>SERPINA1</i>	<i>Serpin Family A Member 1</i>
<i>SLC6A14</i>	<i>Solute Carrier Family 6 Member 14</i>
<i>SLC26A9</i>	<i>Solute Carrier Family 26 Member 9</i>
<i>TLR4</i>	<i>Toll Like Receptor 4</i>
qPCR	PCR em tempo real
VEF1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL	16
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
4	REVISÃO DA LITERATURA	17
4.1	ASPECTOS GERAIS DA FIBROSE CÍSTICA	17
4.2	OS GENES <i>SERPINA1</i> , <i>SLC6A14</i> e <i>SLC26A9</i> E A FIBROSE CÍSTICA	22
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	CAMPO DE ESTUDO	27
5.2	DESENHO DO ESTUDO	27
5.3	POPULAÇÃO	27
5.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	27
5.5	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	28
5.6	COLETA DOS DADOS CLÍNICOS	28
5.7	VARIÁVEIS DO ESTUDO	28
5.8	ANÁLISE MOLECULAR	28
5.9	ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	30
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5.11	ASPECTOS ÉTICOS	32
6	RESULTADOS	33
6.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO	33
6.2	DESCRIÇÃO DAS VARIANTES	34
6.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE RS3788766 (<i>SLC6A14</i>) E VARIÁVEIS CLÍNICAS DA FC	35
6.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE RS7512462 (<i>SLC6A9</i>) E VARIÁVEIS CLÍNICAS DA FC	38
7	DISCUSSÃO	41
8	CONCLUSÕES	44

REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	52
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	53
ANEXO B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	56

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva, multissistêmica e potencialmente letal, com maior incidência em populações caucasianas e frequência estimada em 1:3000 a 1:6000 nascidos vivos, a depender da região geográfica^{1 2 3}. A FC é causada por variantes patogênicas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), localizado na região 7q31.2, sendo constituído por 250 mil pares de bases e 27 éxons⁴.

O gene *CFTR* codifica uma glicoproteína homônima, membro da superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), composta por 1480 aminoácidos⁵, cuja localização é a membrana apical das células epiteliais⁶. Esse polipeptídeo atua como um canal iônico de íons cloreto (Cl⁻) e de bicarbonato (HCO₃⁻)⁷ e a sua regulação é realizada pelo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP)⁸.

A FC tem uma apresentação clínica variada⁹, podendo se manifestar desde o período neonatal ou até mais tardiamente na vida adulta¹⁰. As queixas mais comumente associados à doença incluem sintomas respiratórios recorrentes ou persistentes, déficit no crescimento ou desnutrição e esteatorreia ou evidência fecal da má absorção¹¹.

A heterogeneidade clínica da FC ocorre até mesmo entre os indivíduos que apresentam o mesmo genótipo. Nos sujeitos homocigotos para a variante patogênica F508del, por exemplo, é observada uma grande diversidade na gravidade da doença pulmonar¹². Nos testes genéticos utilizados para o diagnóstico molecular da FC, embora se tente estabelecer uma associação linear entre a variante patogênica no *CFTR* e o fenótipo apresentado, a determinação da influência de um único gene é dificultada pela existência de centenas de variantes e pela interferência de fatores ambientais e de genes modificadores¹³.

O diagnóstico da FC é baseado em um conjunto de sinais clínicos, associados às evidências laboratoriais de disfunção da proteína CFTR. No Brasil, o algoritmo da triagem neonatal, baseado em duas quantificações da tripsina imunorreativa (IRT), detecta os neonatos com indicativo de diagnóstico¹⁴. Em caso de resultado positivo, os indivíduos são encaminhados para um centro de referência, onde serão submetidos ao teste do suor¹⁴.

O teste do suor é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da fibrose cística, sendo que um dos métodos amplamente adotados atualmente é aquele que emprega o sistema *Macroduct*®¹⁵, o qual utiliza a iontoforese de pilocarpina para estimular a sudorese nos indivíduos avaliados¹⁵. Aqueles indivíduos com níveis elevados de cloreto no suor (igual ou acima de 60 mmol/l), observados por meio de dois testes em dias diferentes, podem ter a confirmação diagnóstica¹⁶.

Os sujeitos com fibrose cística confirmada (ou até mesmo em suspeição, devido a resultados inconclusivos do teste do suor) podem ter suas amostras de *DNA* submetidas a testes genéticos, os quais avaliam a presença de variantes patogênicas nos alelos do *CFTR*. Diversas técnicas têm sido utilizadas para esse fim, desde as técnicas mais antigas e laboriosas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, até as técnicas mais modernas que incluem a PCR em tempo real (qPCR) ou o *Next Generation Sequencing* (NGS).

Genes modificadores são aqueles que ocasionam diferenças qualitativas ou quantitativas em qualquer aspecto fenotípico de uma doença. Segundo Houlston e Tomlinson¹⁷, esses genes podem influenciar as manifestações clínicas de uma doença mediante quatro diferentes formas: 1) em células ou tecidos específicos ou por meio de uma ação sistêmica; 2) ao nível da proteína ou do fenótipo da doença, tanto qualitativa, como quantitativamente; 3) por ações específicas ou não específicas sobre as vias patológicas; 4) ação direta ou com a necessidade de ativação através de mutações somáticas ou fatores ambientais específicos¹⁷. Na FC, inúmeros genes modificadores têm sido identificados, incluindo-se aqueles mediadores da resposta inflamatória e anti-inflamatória e da reatividade das vias aéreas, e, também, genes envolvidos no tráfego da proteína CFTR e dos canais iônicos alternativos¹⁸.

Este estudo se propõe a analisar a associação entre as variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*) e 28929474 (*SERPINA1*) e a heterogeneidade das manifestações clínicas da FC, em indivíduos atendidos em um hospital universitário de referência do Nordeste brasileiro.

2 JUSTIFICATIVA

A FC é uma doença complexa e as suas manifestações clínicas podem ser influenciadas por diversos agentes ambientais e genéticos. O estabelecimento da relação genótipo-fenótipo, com algumas exceções, não pode considerar apenas o gene *CFTR*. Os genes modificadores parecem, de fato, estar associados à modulação de uma série de manifestações clínicas, associadas aos sistemas respiratório e digestório dos sujeitos com FC. Dessa forma, faz-se necessário o aprofundamento dos estudos moleculares, de bioinformática e funcionais sobre esses genes e as suas respectivas proteínas.

Esses estudos são imprescindíveis para que, num futuro próximo, seja possível estabelecer um prognóstico mais preciso para cada indivíduo assistido, a partir não apenas do diagnóstico genético relacionado ao *CFTR*, mas também daquele associado aos genes modificadores. Além disso, novos alvos farmacológicos podem ser estabelecidos e novos medicamentos podem ser incluídos no planejamento terapêutico dos profissionais de saúde que manejam sujeitos com FC. Essa inclusão pode ajudar a aperfeiçoar o tratamento, suavizar a gravidade da doença e melhorar a qualidade de vida das pessoas assistidas.

3 OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos cujo estabelecimento serviu de base para dar corpo à base teórica deste estudo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a frequência das variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*) e 28929474 (*SERPINA1*) e analisar sua influência na heterogeneidade das manifestações clínicas de indivíduos com FC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Descrever as variáveis clínicas e epidemiológicas da população estudada;
- ✓ Identificar os genótipos de variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*) e 28929474 (*SERPINA1*);
- ✓ Realizar a análise *in silico* das variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*) e 28929474 (*SERPINA1*);
- ✓ Propor modelos alélicos para a análise de associação entre as variantes estudadas e os marcadores clínicos da gravidade da FC;
- ✓ Avaliar se há a associação entre as variantes dos genes modificadores e os marcadores clínicos da gravidade da FC.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção compreende a base teórica que dá sustentação a este estudo e se apresenta em duas partes, a seguir detalhadas.

4.1 ASPECTOS GERAIS DA FIBROSE CÍSTICA

Definição e Epidemiologia

A FC é uma doença genética, crônica, progressiva e multissistêmica¹⁹, cuja manifestação é de herança autossômica recessiva, mais predominante em populações de origem caucasiana²⁰. No mundo, existem aproximadamente 163 mil indivíduos acometidos pela FC²¹, sendo que cerca de 5.700 deles residem no Brasil¹¹.

A incidência da FC é variável nas diversas regiões geográficas. Na Europa, dados advindos dos programas de triagem neonatal, demonstram uma incidência que varia de 1:3000² a 1:6000 nascidos vivos⁴. Na Australásia, onde a triagem neonatal é bem estabelecida, a FC é identificada em 1:3000 nascidos vivos²². Nos Estados Unidos da América (EUA), onde grandes variações étnicas são observadas^{23 24}, a incidência geral estimada é de 1:3500 nascidos vivos²⁵.

Na América Latina, a incidência da FC é de difícil quantificação em razão da ausência de registros e de programas de triagem neonatal na maioria dos países, além da alta miscigenação étnica²⁶. No Brasil, em estimativa feita por Raskin e colaboradores (2008), com base nos dados de cinco estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais), a incidência média observada foi de 1:7576 nascidos vivos, com uma considerável variação entre os estados analisados²⁷.

Etiologia

A etiologia principal da FC está associada à presença de variantes patogênicas no gene *CFTR*²⁸. Segundo o *Cystic Fibrosis Mutation Database*, mais de 2100 variantes já foram identificadas nesse gene, das quais 401 são consideradas patogênicas²⁹. As

variantes patogênicas que levam ao desenvolvimento da FC são comumente categorizadas em seis classes, de acordo com os seus efeitos sobre a síntese, o transporte e a funcionalidade proteica³⁰.

As variantes patogênicas das classes I a III, por afetarem a tradução ou o transporte da proteína CFTR até a membrana plasmática, são aquelas que, habitualmente, causam um fenótipo clínico mais grave. As variantes incluídas entre as classes IV a VI, por outro lado, acarretam manifestações clínicas mais moderadas, já que seus efeitos afetam apenas a funcionalidade e a estabilidade do polipeptídeo na membrana plasmática³¹.

Fisiopatologia

A disfunção da proteína CFTR diminui a permeabilidade aos íons Cl⁻ e HCO₃⁻ e traz dificuldades ao transporte e à secreção desses ânions, aumentando as suas respectivas concentrações na membrana apical das células epiteliais dos tratos respiratório e gastrointestinal e das glândulas sudoríparas^{32, 13, 33}. Ainda segundo esses autores, cada órgão que depende da CFTR expressa essa disfunção de maneira diferente, de acordo com a sensibilidade de cada um ao déficit funcional.

No epitélio das glândulas sudoríparas, a CFTR defeituosa impede a maior parte da reabsorção dos íons Cl⁻ para a área intersticial, aumentando a concentração desses ânions no lúmen glandular³⁴. Como consequência, os canais transportadores de íons de sódio (Na⁺), numa tentativa de equilibrar as concentrações iônicas, diminuem o fluxo desses cátions para o espaço intersticial, o que eleva o conteúdo de sal dentro do lúmen glandular³⁴. O resultado desse fenômeno é a excreção de um tipo de suor marcado pelo alto teor de cloreto de sódio, o qual se torna uma característica essencial a ser avaliada em testes diagnósticos da doença.

No epitélio respiratório, por sua vez, a ausência ou uma CFTR defeituosa impede o efluxo dos íons Cl⁻ para o meio extracelular, o que leva ao aumento do influxo dos íons Na⁺ e da água para o meio intracelular. Esse desequilíbrio iônico e osmótico acarreta a depleção do líquido que lubrifica e hidrata as vias aéreas (ASL), tornando o muco produzido mais viscoso, dificultando a atividade mucociliar e obstruindo as vias aéreas³⁵. Esse acúmulo de muco forma um ambiente propício para a proliferação de microorganismos, levando a um ciclo de infecção e inflamação que, quando não tratado,

degrada o epitélio respiratório e causa a sua disfunção³⁵. Além disso, o déficit na secreção de HCO₃⁻ para o meio extracelular parece contribuir para a infecção por patógenos, uma vez que níveis menores desse ânion leva à acidificação do ASL³⁶.

No sistema hepatobiliar, a proteína CFTR é ancorada na membrana apical dos colangiócitos e regula o conteúdo de água e eletrólitos da bile, o que promove o transporte de íons Na⁺ e Cl⁻ e a alcalinização e secreção da bile³⁷. A presença de uma CFTR defeituosa pode ocasionar uma secreção deficiente e a deposição de uma bile viscosa e espessa, aumentando a atividade de radicais livres e a suscetibilidade a agentes infecciosos e a outros componentes tóxicos secretados juntos com a bile, o que pode danificar diretamente os hepatócitos^{37 38}. Além disso, ao longo do desenvolvimento da doença hepática associada à fibrose cística (DHRFC), são observadas desordens na secreção de mucina, seguidas por obstrução dos pequenos ductos biliares^{37,38}. A composição anormal e o fluxo reduzido da bile promovem danos aos colangiócitos e à inflamação periductal, além da proliferação dos ductos biliares e a fibrose periportal³⁷. Posteriormente, as células estreladas hepáticas iniciam a produção de colágeno e estimulam a liberação de citocinas pelo epitélio dos ductos biliares, intensificando, dessa forma o processo de fibrose³⁷. Esse processo, ao longo dos anos, pode promover o desenvolvimento da cirrose focal, seguida por cirrose multilobular acompanhada por hipertensão portal³⁷.

Fiorotto e Strazzabosco³⁹ propuseram um novo modelo para explicar a DHRFC. Nessa descrição, a disfunção da proteína CFTR, associada à liberação de produtos da microbiota intestinal para o fígado, contribui para o desenvolvimento da DHRFC. No intestino, a ausência da CFTR promove a mudança da microbiota e o aumento da permeabilidade do epitélio, o qual se torna mais permissivo para a translocação de produtos bacterianos para o fígado. Nos colangiócitos hepáticos, a ausência da proteína CFTR leva à ativação persistente de tirosinas quinases da família SRC, as quais dirigem uma produção anormal de citocinas pró-inflamatórias, mediadas pelo receptor do tipo Toll 4 (TLR4), em respostas às endotoxinas liberadas pelas bactérias intestinais³⁹. Esse ambiente inflamatório altera as funções do citoesqueleto e das junções comunicantes do epitélio da vesícula biliar, impedindo que ele funcione como uma barreira, o que promove a difusão retrógrada da bile e o consequente dano tecidual³⁹.

O gene *CFTR* é fortemente expresso no epitélio do trato gastrointestinal^{40 41}. É observado um gradiente de expressão que aumenta no sentido proximal-distal e ao longo do eixo cripta-vilosidade, com altos níveis do RNA mensageiro (mRNA) do *CFTR* no duodeno, inclusive nas glândulas de Brunner, e uma redução distal dos níveis dessa molécula nas regiões próximas ao íleo⁴²; a localização da expressão do *CFTR* no intestino reflete a necessidade do HCO₃⁻ e da secreção de fluidos. O HCO₃⁻ secretado nas regiões proximais do intestino consegue neutralizar o ácido gástrico proveniente do conteúdo estomacal. Essa neutralização é necessária para a atividade das enzimas digestivas secretadas pelo pâncreas exócrino e para a solubilidade dos sais biliares, liberados pelo trato biliar. Quando a proteína CFTR está ausente ou atua deficientemente, o ácido gástrico não é neutralizado de forma apropriada e, dessa forma, há o enfraquecimento da função digestiva no intestino. Esse fenômeno, associado à redução da hidratação do conteúdo intestinal, promove uma série de complicações no trato gastrointestinal dos pacientes com FC⁴².

Manifestações Clínicas

A síndrome clínica relacionada à diminuição ou perda da função da CFTR é multissistêmica e apresenta-se por um conjunto amplo e heterogêneo de manifestações¹³. No sistema respiratório, o acometimento das vias aéreas é progressivo e de intensidade variável¹⁰. São observadas doença pulmonar e sinusal crônica, com períodos de exacerbação, que se caracterizam pela presença de sinusites, bronquites, pneumonias de repetição e bronquiectasias^{10,43}. A doença pulmonar é a principal causa da morbimortalidade da FC¹³.

A expressão do fenótipo da doença pulmonar na FC é altamente variável, mesmo em indivíduos com o mesmo genótipo do *CFTR*. Essa variação é fortemente influenciada por fatores ambientais (exposição ao tabaco, infecções bacterianas, *status* socioeconômico e nutricional⁴⁴). Além disso, o efeito de variantes genéticas não relacionadas ao gene *CFTR* também tem sido estimado. O estudo de Vanscoy e colaboradores⁴⁵, ao comparar a similaridade do fenótipo pulmonar de irmãos gêmeos mono e dizigóticos, observou uma concordância fenotípica maior nos gêmeos monozigóticos. A similaridade da função pulmonar entre os gêmeos dizigóticos foi

equivalente àquela observada entre os sujeitos com FC sem relações familiares⁴⁵. Os autores supracitados estimaram que fatores genéticos não relacionados ao gene *CFTR* responderam por 50 a 80% da variabilidade fenotípica observada em indivíduos com o mesmo genótipo para o *CFTR* (homozigotos para a variante patogênica F508del).

No trato gastrointestinal e anexos, o íleo meconial é uma forma de apresentação clínica precoce, apresentando-se na fase neonatal e caracterizando-se pela dificuldade de eliminação do mecônio, acompanhado por sinais de obstrução intestinal e distensão abdominal¹⁰. Segundo Dupuis e colaboradores⁴⁶, a associação entre o fenótipo do íleo meconial e o genótipo do *CFTR* parece predominar para variantes patogênicas específicas das classes I e II. Esses autores ressaltam, entretanto, que fatores ambientais (exposição pré-natal a drogas) e variantes em determinados genes (*SLC6A14*, *SLC9A3* e *SLC26A9*) podem estar associados e, assim, modificar a susceptibilidade ao íleo meconial.

A insuficiência pancreática exócrina (IPE) é a manifestação clínica mais comum e importante associada ao aparelho digestório dos sujeitos com FC¹⁰, ocorrendo esteatorreia e a perda calórica associada à desnutrição e má absorção⁴⁷. A presença de IPE correlaciona-se, de forma próxima, com as variantes patogênicas do *CFTR*, assim, aqueles sujeitos que apresentam duas variantes que levam à ausência de função do polipeptídio (classes I a III) tendem a apresentar insuficiência pancreática precoce, frequentemente ao nascimento. Por outro lado, indivíduos com pelo menos uma variante que promova a função residual da proteína (das classes IV a VI), geralmente, apresentam suficiência pancreática ao nascimento⁴⁸. Quanto às manifestações clínicas do sistema hepatobiliar, a DHRFC, usualmente, desenvolve-se até a adolescência, caracterizando-se por um curso clínico lento, porém progressivo, na maioria das vezes⁴⁹. As manifestações clínicas associadas à DHRFC incluem elevação assintomáticas de enzimas hepáticas no sangue, hepatomegalia, esteatose hepática, cirrose biliar focal, cirrose biliar multilobular, colelitíase e colecistite³⁸. Segundo Kobelska-Dubiel e colaboradores³⁷, é estabelecido que as alterações no sistema hepatobiliar ocorrem apenas naqueles indivíduos com variantes patogênicas graves do gene *CFTR* das classes I e II. Entretanto, os autores destacam que apenas um pequeno número de indivíduos, com variantes graves, apresenta a DHRFC, por razões ainda não esclarecidas. Fatores como idade ao diagnóstico, sexo, presença de íleo meconial e a insuficiência do pâncreas exócrino parecem influenciar a ocorrência dessa complicação⁵⁰. Além disso, outros fatores genéticos não relacionados ao *CFTR*,

como variantes no gene *SERPINA1*, podem estar associados ao risco de desenvolvimento da DHRFC⁵¹.

4.2 OS GENES *SERPINA1*, *SLC6A14* E *SLC26A9* E A FIBROSE CÍSTICA

GENE *SERPINA1*

O gene *SERPINA 1* (*Serpin Family A Member 1*) está localizado na região 14q31-32.3 e codifica a glicoproteína alfa-1antitripsina (AAT)⁵². A AAT faz parte da superfamília dos inibidores de proteases serinas e tem como principal função inibir uma série de enzimas, principalmente a elastase neutrofílica e, assim, proteger os tecidos do dano proteolítico gerado por processos inflamatórios⁵³. Essa proteína é sintetizada naturalmente no fígado, antes de ser direcionada para a circulação⁵⁴. Há também uma produção em menor escala realizada por neutrófilos, monócitos e enterócitos⁵⁵ e por células epiteliais dos brônquios⁵⁶.

Os pulmões de indivíduos com FC são um ambiente rico em proteases, o que torna a atividade dos inibidores de proteases insuficiente para a prevenção da destruição irreversível do epitélio respiratório⁵⁵. Esse desequilíbrio contribui para a doença pulmonar relacionada à FC⁵⁷ e foi um componente de interesse para estudos que investigaram o potencial terapêutico das antiproteases nessa doença⁵⁵. McElvaney e colaboradores⁵⁸ concluíram que a grande variabilidade dos níveis da elastase neutrofílica, observada nos pulmões desses indivíduos, dificulta a padronização de uma dosagem adequada para a reposição desta glicoproteína, apesar do potencial terapêutico da reposição de AAT em sujeitos com FC, realizada tanto de forma intravenosa, quanto de forma inalada.

Variantes no gene *SERPINA1* levam à uma polimerização inadequada da proteína AAT, a qual se acumula no lúmen do retículo endoplasmático dos hepatócitos⁵⁹. Esse acúmulo pode levar ao desenvolvimento de cirrose, fibrose e, em casos mais graves, carcinoma hepatocelular⁵³. Em estudos de associação realizados com sujeitos da França e América do Norte, o alelo Z (rs28929474) do gene *SERPINA1* foi associado ao aumento do risco para o desenvolvimento da DHRFC^{51 60}. Nesse sentido, o número de estudos relacionados à terapia gênica direcionada à AAT tem crescido, principalmente aqueles

voltados para a deficiência de alfa-1 antitripsina (DAAT), cujos resultados podem ser aplicáveis para a FC⁵⁵.

O estudo de Mueller e colaboradores⁶¹, voltado para o tratamento da DAAT, desenvolveu diversos vetores de AAV recombinante (rAAV), incorporados com microRNAs (miRNAs), com o objetivo de silenciar a expressão do gene *SERPINA1* mutado com a variante rs28929474 e aumentar a expressão da forma selvagem desse gene em um modelo animal. O rato transgênico apresentou silenciamento do gene *SERPINA1* mutante no fígado e no plasma e o aumento da expressão da proteína selvagem circulante; além disso, foi observada redução dos níveis de AAT truncada nos hepatócitos e dos infiltrados inflamatórios no fígado.

No que diz respeito à FC, Hunt e colaboradores⁵⁵ sugeriram, como uma futura abordagem terapêutica para a doença pulmonar, a inibição dos miRNAs que se ligam à região 3'UTR do mRNA do *SERPINA1*, através de anti-miRNAs e bloqueadores de sítio alvo, o que levaria ao aumento da expressão gênica, dos níveis de AAT e da atividade antiproteolítica nos pulmões.

GENE *SLC6A14*

O gene *SLC6A14* (*Solute Carrier Family 6 Member 14*) está localizado na região Xq23 e expressa a proteína conhecida como membro 14 da família 6 dos transportadores de soluto, a qual utiliza a energia proveniente do gradiente dos íons de sódio e cloro para concentrar todos os aminoácidos neutros, e 2 aminoácidos catiônicos (lisina e arginina), no citoplasma de diversos tipos celulares⁶². O estudo de associação ampla do genoma (GWAS), realizado por Sun e colaboradores (2012), evidenciou os alelos rs3788766*T e rs5905283*C do gene *SLC6A14* como alelos de risco para o íleo meconial⁶³. Li e colaboradores (2014), por sua vez, identificaram um efeito pleiotrópico do alelo de risco rs3788766*T sobre o íleo meconial, sobre a doença pulmonar e a idade da primeira infecção por *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁴.

No Brasil, dois estudos foram realizados com indivíduos com FC acompanhados em um centro de referência do estado de São Paulo. No primeiro, foi observada a relação do alelo rs3788766*T com o aumento do risco para infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, perda da função pulmonar e início precoce dos sintomas pulmonares em pacientes

portadores de variantes patogênicas das classes I, II e III⁶⁵. No segundo trabalho, foi observado que a interação entre os polimorfismos rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*), rs17563161 (*SLC9A3*) e variantes patogênicas do *CFTR* parecem influenciar um conjunto de sintomas digestivos⁶⁶.

Quanto à influência da *SLC6A14* na fisiopatologia da doença pulmonar, é sugerido que essa proteína, ao funcionar como um transportador de aminoácidos, seja expressa e ativada rapidamente durante a infecção, para diminuir a quantidade de aminoácidos disponíveis no líquido da superfície das vias aéreas, através do transporte e da concentração dessas moléculas no citoplasma das células epiteliais, o que resulta na redução da infecção bacteriana sobre a superfície epitelial^{67 68}.

A proteína *SLC6A14* pode interferir indiretamente na fisiopatologia da doença pulmonar, por sua influência sobre a atividade da proteína *CFTR*. Ahmadi e colaboradores (2019) afirmam que o transporte de arginina através da *SLC6A14* aumenta o efluxo do cloreto pela *CFTR* mutante (F508del-*CFTR*) na superfície das vias aéreas, estando a *CFTR* estimulada ou não pelo corretor Lumacaftor⁶⁹. Também foi observado que esse aumento da função da *CFTR* induz ao aumento do nível do líquido das vias aéreas e que a potenciação ocorre pela via de sinalização do óxido nítrico (NO)⁶⁹. Os mesmos autores sugerem que a ativação da *SLC6A14* pode ser considerada uma terapia complementar à correção e potenciação do *CFTR* nos sujeitos com FC⁶⁹.

GENE *SLC26A9*

O gene *SLC26A9* (*Solute Carrier Family 26 Member 9*) está localizado na região 1q32.1 e é constituído por 30,425 pares de bases e 21 éxons⁷⁰. Ele codifica uma proteína homônima, cuja isoforma canônica é formada por 791 resíduos de aminoácidos e cuja estrutura, bem conservada dentro da família de transportadores aniônicos *SL26*, é formada por dois domínios: um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, denominado *STAS* (*Sulphate Transporter and Anti-sigma Factor Antagonist*)⁷¹.

O transportador *SLC26A9* está localizado no epitélio dos pulmões, estômago, intestino e pâncreas^{72 73 74}. Nesses órgãos, o membro A9 pode atuar como um permutador de íons $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, como um canal de Cl^- ou um cotransportador de Na^+ ⁶⁸ e contribuir, por exemplo, para a depuração das vias aéreas e a produção do ácido gástrico⁷⁵. Todavia,

a contribuição do SLC26A9 para a produção do bicarbonato epitelial e para o transporte de sódio não é bem compreendida e é possível que o modo de transporte seja dependente da célula e do tecido onde o canal esteja localizado⁷⁶.

Muitos membros da família SLC26 são expressos conjuntamente com a proteína CFTR em epitélios de todo o corpo, inclusive naqueles que constituem órgãos acometidos na fibrose cística⁷⁷. Nesse sentido, o estudo de Bertrand e colaboradores (2009), realizado com linhagens de células *HEK 293*, evidenciou a formação de um complexo SLC26A9/CFTR e mostrou que a expressão conjunta desses transportadores parece aperfeiçoar o transporte de cloreto, quando estimulado por fosfocolina, sugerindo um mecanismo de interação regulatória recíproca⁷⁸.

Diante das evidências que corroboram a interação entre as proteínas SLC26A9 e CFTR, inúmeros trabalhos têm investigado os efeitos de variantes no gene *SLC26A9* sobre as comorbidades associadas à fibrose cística e sobre a resposta ao tratamento. O estudo de Li e colaboradores⁶⁴ evidenciou o efeito pleiotrópico do *SCL26A9* em manifestações relacionadas ao pâncreas. O alelo T da variante rs7512462 foi associado tanto ao risco de desenvolvimento do íleo meconial, quanto ao dano pancreático associado aos níveis da IRT ao nascimento⁶⁴. Como limitação do estudo, os autores destacaram o número restrito de sujeitos incluídos com medidas de IRT disponíveis.

No trabalho de Miller e colaboradores⁷⁹, o alelo de risco 7512462*T foi associado à doença pancreática exócrina pré-natal, em estudo realizado em recém-nascidos de dois estados norte-americanos. A associação foi observada tanto na análise isolada da população de cada estado, quanto na avaliação combinada das duas populações⁷⁴. A mesma relação foi observada no grupo de indivíduos homocigotos para a variante patogênica F508del⁷⁹.

Por outro lado, Lam e colaboradores⁸⁰ demonstraram que um conjunto de variantes no gene *SLC26A9* formou um haplótipo de baixo risco para a diabetes relacionadas à FC (DRFC). Este haplótipo foi associado ao aumento da expressão proteica nas linhas celulares *PANC-1* e *CFPAC-1*. A partir disso, os autores concluíram que a adoção de estratégias que aumentem a expressão da proteína SLC26A9 nos ductos pancreáticos de pacientes com FC podem retardar a DRFC.

Quanto à influência do gene *SCL6A29* na resposta ao tratamento, Corvol e colaboradores (2018) observaram que sete variantes desse gene foram associadas à

resposta pulmonar em tratamento com o fármaco Ivacaftor ao longo de um ano, a qual foi medida pelo volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1), em indivíduos com FC insuficientes pancreáticos e portadores de variantes patogênicas que alteram o *gating* da CFTR⁸¹.

O genótipo CC da variante rs7512462 foi associado à redução do VEF1 em 7,7%, nos indivíduos portadores de, pelo menos, um alelo com a variante G551D⁸¹. Os autores sugerem que as referidas variantes impactam as interações SLC26A9-CFTR-G551D, o que pode alterar o tráfego intracelular ou a ativação do CFTR-G551D e afetar a resposta ao Ivacaftor.

No Brasil, o estudo de Kmit e colaboradores⁸², que incluiu indivíduos com FC de um centro de referência do estado de São Paulo, investigou a resposta funcional da CFTR de células epiteliais nasais extraídas de sujeitos homocigotos para a variante patogênica F508del, com três diferentes genótipos para a variante rs7512462 do gene *SCL26A9* (TT, CT, CC), quando expostas a diferentes combinações farmacológicas. Os autores observaram que a função basal do CFTR foi maior em células de indivíduos portadores do alelo C do polimorfismo rs7512462 (CT ou CC) e que foram expostas a uma combinação de dois moduladores: VX-770 (Ivacaftor) + VX-809 (Lumacaftor).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende os procedimentos metodológicos adotados para dar cumprimento aos objetivos estabelecidos neste estudo.

5.1 CAMPO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Ambulatório Interdisciplinar de Fibrose Cística (AIFC), do Ambulatório Professor Francisco Magalhães Neto, do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Complexo-HUPES), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), em Salvador, Bahia. O AIFC é composto por uma equipe formada por médicos(as) pneumologistas, enfermeiros(as), farmacêuticos(as), fisioterapeutas, nutricionistas e técnicos em saúde, a qual oferece atendimento a cerca de 65 indivíduos com FC, principalmente crianças e adolescentes, residentes em algum dos diversos municípios baianos. Esses sujeitos são, geralmente, acompanhados em consultas trimestrais ou mais frequentemente para os menores de 2 anos, ou sempre que se faz necessário.

5.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo de corte transversal, realizado no período de janeiro de 2020 a junho de 2022.

5.3 POPULAÇÃO

A população foi composta por todos os indivíduos com diagnóstico de FC, atendidos regularmente no AIFC do Complexo-HUPES.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- a) Sujeitos de ambos os sexos e todas as faixas etárias, com diagnóstico de FC confirmado pelo teste do suor positivo (elevação de cloreto no suor maior que ≥ 60 mEq L⁻¹), em duas amostras e/ou identificação duas variantes patogênicas no gene *CFTR*;
- b) Acompanhamento regular no AIFC.

5.5 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Indivíduos cujos genótipos para as variantes rs3788766, rs28929474 e rs7512462 não foram determinados.

5.6 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos foram coletados com base nos registros dos prontuários médicos. Estudaram-se as variáveis clínicas e as variantes rs3788766, rs7512462 e rs28929474, dos genes *SLC6A14*, *SLC26A9* e *SERPINA1*, respectivamente.

5.7 VARIÁVEIS DO ESTUDO

- Sexo
- Idade
- Variantes patogênicas do gene *CFTR*
- Z-Score do Índice de Massa Corporal (IMC)
- Uso de pancreatina
- Ocorrência episódios de exacerbação pulmonar (nos últimos 2 anos)
- Uso de dornase alfa
- Uso de tobramicina inalatória
- Ocorrência de infecção do trato respiratório por *P. aeruginosa*
- Idade da primeira infecção por *P. aeruginosa*

5.8 ANÁLISE MOLECULAR

Extração e Quantificação do DNA Genômico

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos à punção venosa para obtenção de amostra de sangue para pesquisa de genes estudados. Os seguintes procedimentos foram realizados: a antisepsia da pele com álcool a 70,0% e coleta de cerca de 2 mL de sangue, através de punção venosa periférica, com catéter plástico descartável. Adicionou-se 1 mL de sangue em frasco com 0,02 mL de *EDTA*.

Posteriormente, o volume sanguíneo foi centrifugado a 3500 rpm, durante 20 minutos, para a obtenção do *buffy coat*, o qual foi armazenado sob temperatura de -20°C . O DNA genômico foi extraído utilizando-se o *kit* comercial *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen™* (Carlsbad, EUA), seguindo-se todas as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram estocadas em uma temperatura de -20°C e, posteriormente, quantificadas e qualificadas com auxílio de um espectrofotômetro, modelo BioDrop.

Determinação do Genótipo do Gene CFTR

Para a determinação das variantes patogênicas do gene *CFTR*, as amostras de DNA dos indivíduos incluídos no estudo foram submetidas ao rastreamento de sete variantes patogênicas, o qual foi realizada através de métodos convencionais (PCR e digestão enzimática). Caso dois alelos patogênicos não tenham sido evidenciados, o DNA extraído de amostras de mucosa oral foi submetido ao *NGS* através da plataforma *Illumina HiSeq*.

PCR em Tempo Real (qPCR)

As amostras de DNA foram submetidas à técnica de qPCR, objetivando-se caracterizar o perfil genético desses pacientes para as variantes dos genes modificadores em análise no presente estudo. As variantes pesquisadas foram: rs3788766 (*SLC6A14*), rs28929474 (*SERPINA1*) e rs7512462 (*SLC26A9*).

A qPCR foi conduzida em um termociclador modelo *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems™* (Carlsbad, EUA). As variantes foram investigadas por meio da tecnologia *TaqMan® SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems™* (Carlsbad, EUA). A concentração das amostras de DNA foi uniformizada em 5 ng/uL e o volume final da reação foi de 5uL. As seguintes etapas de ciclagem térmica foram realizadas: 95°C durante 10 minutos; 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos / 60°C durante 1 minuto e um passo de extensão de 60°C durante 30 segundos. Foram incluídos em cada placa de genotipagem os controles negativos para a garantia de qualidade dos resultados.

5.9 ANÁLISE *IN SILICO*

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para a distribuição genotípica associada às variantes rs28929474 (*SERPINA1*), rs3788766 (*SLC6A14*) e rs7512462 (*SLC26A9*) foi analisado pela plataforma *Gene-Calc*⁸³. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para a caracterização do equilíbrio genético. A anotação genômica das variantes supracitadas foi consultada no banco de dados dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). As plataformas *HaploReg 4.1*⁸⁴ e *RegulomeDB 2.0.3*⁸⁵ foram utilizadas para a avaliação da relação das variantes com regiões regulatórias da expressão gênica. O *HaploReg* é uma ferramenta que explora as anotações de genomas não codificantes entre os resultados de *GWAS* publicados ou de novos *sets* de variantes e que permite, por exemplo, realizar a predição dos efeitos das variantes sobre motivos regulatórios⁸⁴. O *RegulomeDB*, por sua vez, é um banco de dados que analisa as variantes com elementos regulatórios das regiões intergênicas conhecidas do genoma da espécie *Homo sapiens*⁸⁵. Esses elementos incluem regiões de hipersensibilidade à *DNase*, sítios de ligação de fatores de transcrição e regiões promotoras⁸⁵. Uma classificação numérica de 1 a 7 representa o grau de confiança crescente relacionado à localização da variante em uma região funcional e o consequente efeito na regulação da expressão gênica. As pontuações de 1 a 3 indicam uma possível alteração na ligação a fatores de transcrição, enquanto as pontuações de 4 a 6 indicam ausência de evidência para a ocorrência deste efeito. Não há informações sobre a pontuação 7.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram registrados em questionário padrão e armazenados em um banco de dados no programa Microsoft Excel 365[®]. As análises estatísticas foram realizadas por meio dos softwares *RStudio 2022.07.0* e *IBM SPSS Statistics*[®] 28.0.1.1. As frequências absolutas e relativas foram calculadas para cada variável ou categoria analisada. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para a avaliação da normalidade da distribuição dos dados referentes à idade e ao Z-score do IMC⁸⁶. A média e o desvio padrão foram calculados para as variáveis cujos valores estiveram dentro da normalidade. Oito variáveis foram selecionadas para a análise de associação com as variantes relacionadas aos genes modificadores: variantes patogênicas do gene *CFTR*, Z-score do

IMC, utilização de dornase alfa, ocorrência de episódios de exacerbação pulmonar, uso de pancreatina, uso contínuo de tobramicina inalatória, ocorrência de infecção do trato respiratório por *P. aeruginosa* e idade da primeira infecção por *P. aeruginosa*.

A variável “variantes patogênicas do gene *CFTR*,” foi categorizada em três grupos: 1) genótipos homozigotos para a variante patogênica F508del (F508del/F508del), 2) genótipos heterozigotos compostos para a variante patogênica F508del e outra variante das classes I a III (F08del/Classes I a III) e 3) genótipos heterozigotos compostos para a F508del e outra variante patogênica das classes IV a VI (F508del/Classes IV a VI). Os softwares *WHO Anтро*⁸⁷ e *WHO Anтро Plus*⁸⁸ foram utilizados para o cálculo do Z-score do IMC para crianças até os 5 anos e entre 6 e 19 anos, respectivamente. A categoria de risco nutricional foi criada de acordo com os valores do Z-score do IMC, utilizando os valores referencias definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)^{89 90}, adaptados para as características específicas da população do AIFC. Dentro da categoria supracitada dois subgrupos foram criados: sobrepeso e desnutrição. Para os participantes até os 5 anos, os z-scores do IMC abaixo de -0,5 foram incluídos no subgrupo desnutrição e aqueles acima de 1,5 foram incluídos no subgrupo sobrepeso. No que diz respeito às crianças com idade entre 6 e 19 anos, os valores de z-score referenciais para o subgrupo desnutrição foram aqueles abaixo de -0,5 e aqueles acima de 1 foram subgrupados como sobrepeso.

As variáveis “uso de dornase alfa”, “uso de tobramicina inalatória”, “ocorrência de episódios de exacerbação pulmonar” foram adotadas como marcadores da doença pulmonar. A variável “idade da primeira infecção por *P. aeruginosa*” foi categorizada em três subgrupos: primeira infecção até os 11 meses e 29 dias, primeira infecção entre 12 meses e 59 meses e 29 dias e primeira infecção acima dos 60 meses. A variável “uso de pancreatina” foi considerada um marcador da insuficiência pancreática. A definição de exacerbação pulmonar foi aquela adotada pelo centro de referência.

A análise de associação entre as variantes e as variáveis demográficas e clínicas foi baseada em uma regressão logística binomial, sendo considerados quatro modelos: alélico, dominante, recessivo e aditivo. Para associação com o polimorfismo rs3788766 do gene *SLC6A14*, localizado no cromossomo X, a variável sexo foi considerada para o ajuste dos dados. Associações com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5.11 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo compõe um projeto mais amplo, intitulado *Estudo clínico-epidemiológico da fibrose cística em um centro de referência em Salvador, BA*, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (CEP-HUPES), sob o parecer de número 1.759.008, de outubro de 2016, contando com a última emenda aprovada em março de 2022, sob o parecer de número 5.287.108.

Os indivíduos incluídos na pesquisa ou os seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e, quando pertinente, as crianças assinaram o termo de assentimento, em conformidade com a última versão da *Declaração de Helsinque* (ano de 2013) e a Resolução n. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão reunidos em quatro partes, conforme detalhamento a seguir.

6.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Incluíram-se 56 participantes, excluindo-se três porque os genótipos não foram determinados pela análise molecular; 32 (57,14%) são do sexo masculino, média (DP) de idade de 116,36 (71,59), sendo que 17 (30,36%) têm idade abaixo dos 72 meses. A Tabela 1 evidencia as características da população, conforme as variáveis clínicas selecionadas para compor o estudo.

Tabela 1- Características da população de acordo com as variáveis estudadas (N=56).

Variáveis	N (%)	Média (DP) ^a
Sexo		
Masculino	32 (57,14%)	
Feminino	24 (42,86%)	
Idade (em meses)		116,36 (±71,59)
Genótipo	33 (58,93%)	
F508del/F508del	16 (48,48%)	
F508del/Classes I a III	14 (42,42%)	
F508del/Classes IV a VI	3 (9,1%)	
Z-score do IMC^c		- 0,11 (±1,31)
Risco nutricional	27 (54,00%)	
Sobrepeso	8 (29,63%)	
Desnutrição	19 (70,37%)	
Uso de Pancreatina^d		
Sim	42 (77,78%)	
Não	12 (22,22%)	
Exacerbação pulmonar		
Sim	9 (16,98%)	
Não	44 (83,02%)	
Uso de Dornase Alfa^e		
Sim	31 (57,41%)	
Não	23 (42,59%)	
Uso de Tobramicina inalatória		
Sim	12 (22,22%)	
Não	42 (77,78%)	
Infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Sim	25 (44,64%)	

Não 29 (51,79%)

Idade da 1ª infecção por *P. aeruginosa* (em meses)^f

54,84 (±54,76)

1ª infecção até 11 meses e 29 dias

Sim 11 (44,00%)

Não 14 (56,00%)

1ª infecção entre 12 meses e 59 meses e 29 dias

Sim 8 (32,00%)

Não 17 (68,00%)

1ª infecção acima dos 60 meses

Sim 6 (24,00%)

Não 19 (76,00%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: a: DP – desvio padrão. b: um dos alelos do *CFTR* de dois indivíduos heterozigotos compostos para a variante patogênica F508del não teve variantes patogênicas identificadas e três indivíduos heterozigotos compostos para a variante patogênica F508del apresentaram uma variante patogênica cuja classificação ainda não está descrita na literatura. c: o z-score de seis indivíduos não foram calculados pela indisponibilidade dos dados ou pela limitação do *WHO Anthro Plus*. d: os dados sobre o uso da pancreatina de dois indivíduos não estavam disponíveis. e: os dados sobre o uso da dornase alfa de dois indivíduos não estavam disponíveis. f: os dados sobre a idade da primeira infecção por *P. aeruginosa* de dois indivíduos não estavam disponíveis.

6.2 DESCRIÇÃO DAS VARIANTES

As informações genéticas e funcionais das variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*) e rs28929474 (*SERPINA1*) estão descritas na Tabela 2. O alelo T do polimorfismo rs28929474 não foi observado entre os indivíduos da população estudada e, dessa forma, essa variante não foi incluída nas análises de associação com as variáveis clínicas da FC.

Tabela 2- Descrição genética e funcional das variantes estudadas.

Variante	A1/A2 ^a	Frequência	HWE ^b	Posição (h38)	Anotação ^c	RegulomeDB	Haploreg ^d
rs3788766	A/G	0,41	0,73	116435671	<i>Upstream Transcript Variant</i>	2b	EHM, DNase, MC
rs7512462	C/T	0,4	0,84	205930467	Intrônico	4	EHM, PBR, MC, eQTL
rs28929474	C/T	-	-	94378610	<i>Missense</i>	4	EHM, DNase, PBR, MC

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda a: A1 - alelo de menor frequência/A2: alelo principal. b: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. c: NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia). d: *EHM* – *Enhancer histone marks*; *PBR* – *Proteins Bound*; *MC* – *Motifs Changed*; *eQTL* – *Expression quantitative trait loci*.

6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE RS3788766 (*SLC6A14*) E VARIÁVEIS CLÍNICAS DA FC

A variante rs3788766 foi associada significativamente a três variáveis clínicas da FC: uso de dornase alfa, exacerbação pulmonar e risco nutricional (Tabela 3). Com relação a esta última variável, houve associações significativas em ambos os grupos sobrepeso e desnutrição. Nos modelos alélico, recessivo e aditivo, a presença do alelo rs3788766*A elevou as chances de risco nutricional relacionado ao sobrepeso e diminuiu as chances do risco nutricional relacionado à desnutrição.

No que diz respeito aos parâmetros adotados como marcadores da doença pulmonar, a presença do alelo rs3788766*A representou menores chances de uso da dornase alfa, quando os modelos recessivo e aditivo são considerados. Por outro lado, dentro do modelo dominante, a presença desse mesmo alelo representou um aumento de chances para a ocorrência de exacerbação pulmonar. Em nenhum dos modelos considerados houve associação significativa da variante rs3788766 com a ocorrência e a idade da primeira infecção por *P. aeruginosa*.

Tabela 3- Associações entre a variante rs3788766 (*SLC6A14*) e variáveis clínicas da FC.

Modelo	Alelos/ Genótipos	Uso de Dornase Alfa			Risco nutricional		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	P-valor ^c
Alélico	G	-	1		-	1	
	A	-	0,51 (0,25 – 0,99)	0,05	-	1,77 (0,88 – 3,83)	0,12
Dominante	GG	18 (58,06%)	1		12 (44,44%)	1	
	AG + AA	13 (41,94%)	2,56 (0,79- 8,88)	0,12	15 (55,56%)	0,72 (0,21-2,38)	0,59
Recessivo	AG + GG	5 (16,13%)	1		11 (40,74%)	1	
	AA	26 (83,87%)	0,23 (0,05 – 0,87)	0,04	16 (59,26%)	7,44 (1,59 – 55,48)	0,02
Aditivo	GG	18 (58,06%)	1		12 (44,44%)	1	
	AG	8 (25,80%)	1,06 (0,18 – 6,29)	0,95	4 (14,81%)	0,16 (0,02 – 1,02)	0,07
	AA	5 (16,13%)	0,23 (0,05 – 0,91)	0,04	11 (40,74%)	5,98 (1,18 – 46,74)	0,04
Modelo	Alelos/ Genótipos	Sobrepeso			Desnutrição		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	P-valor ^c

Alélico	G	-	1	0,03	-	1	0,03
	A	-	4,48 (1,42 – 26,74)		-	0,22 (0,04 – 0,70)	
Dominante	GG	1 (12,50%)	1	0,05	11 (57,90%)	1	0,05
	AG + AA	7 (87,50%)	0,10 (0-0,76)		8 (42,10%)	9,56 (1,32-198,33)	
Recessivo	AG + GG	2 (25,00%)	1	0,02	14 (73,68%)	1	0,02
	AA	6 (75,00%)	16,03 (1,97 – 370,77)		5 (26,32%)	0,06 (0 – 0,51)	
Aditivo	GG	1 (12,50%)	1	0,66	11 (57,90%)	1	0,66
	AG	1 (12,50%)	2,03 (0,06 – 69,86)		3 (15,78%)	0,49 (0,01 – 16,34)	
	AA	6 (75,00%)	19,73 (2,04 – 654,75)		5 (26,32%)	0,05 (0 – 0,49)	

Modelo	Alelos/ Genótipos	Exacerbação pulmonar			Uso de pancreatina		
		N% (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	P-valor ^c
Alélico	G	-	1	0,07	-	1	0,92
	A	-	2,56 (0,98 – 8,39)		-	1,04 (0,49 – 2,35)	
Dominante	GG	1 (11,11%)	1	0,04	20 (48,78%)	1	0,98
	AG + AA	8 (88,89%)	9,09 (1,41-100)		21 (51,22%)	1,02 (0,26 - 4)	
Recessivo	AG + GG	3 (33,33%)	1	0,27	11 (26,83%)	1	0,87
	AA	6 (66,67%)	2,64 (0,43 – 16,27)		30 (73,17%)	1,14 (0,26 – 6,10)	
Aditivo	GG	1 (11,11%)	1	0,07	20 (48,78%)	1	0,87
	AG	5 (55,56%)	14,92 (1,25 – 600,42)		10 (24,39%)	0,86 (0,09 – 6,77)	
	AA	3 (33,33%)	7,52 (0,85 – 162,82)		11(26,83%)	1,11 (0,24 – 6,11)	

Modelo	Alelos/ Genótipos	Uso de Tobramicina inalatória			Infecção por <i>P. aeruginosa</i>		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	P-valor ^c
Alélico	G	-	1	0,79	-	1	0,68
	A	-	0,89 (0,36 – 2,03)		-	0,87 (0,46 – 1,66)	

Dominante	GG	5 (45,45%)	1		12 (48,00%)	1	
	AG + AA	6 (54,55%)	1 (0,23 - 4,17)	1	13 (52,00%)	1,13 (0,37 - 3,52)	0,83
Recessivo	AG + GG	2 (18,18%)	1		19 (76,00%)	1	
	AA	9 (81,82%)	0,64 (0,09 - 3,22)	0,61	6 (24,00%)	0,68 (0,18 - 2,49)	0,57
Aditivo	GG	5 (45,45%)	1		12 (48,00%)	1	
	AG	4 (36,36%)	1,61 (0,23 - 14,72)	0,64	7 (28,00%)	1,35 (0,24 - 8,07)	0,73
	AA	2 (18,18%)	0,71 (0,09 - 3,89)	0,71	6 (24,00%)	0,71 (0,18 - 2,64)	0,61

Modelo	Alelos/ Genótipo	Infecção até 11 meses e 29 dias			Infecção entre 12 meses e 59 meses e 29 dias		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	G	-	1		-	1	
	A	-	2,12 (0,99-5,02)	0,06	-	0,97 (0,47 - 2,00)	0,94
Dominante	GG	4 (28,57%)	1		8 (50,00%)	1	
	AG + AA	10 (71,43%)	0,28 (0,06 - 1,08)	0,07	7 (43,75%)	1,04 (0,28 - 3,85)	0,95
Recessivo	AG + GG	8 (57,14%)	1		10 (62,50%)	1	
	AA	6 (42,86%)	3,91 (0,85-21,93)	0,09	5 (31,25%)	0,95 (0,21-3,95)	0,94
Aditivo	GG	4 (28,57%)	1		8 (50,00%)	1	
	AG	4 (28,57%)	2,33 (0,32-19,47)	0,41	2 (12,50%)	0,99 (0,09-10,48)	0,99
	AA	6 (42,86%)	4,46 (1,93-25,84)	0,07	5 (31,25%)	0,95 (0,21-4,03)	0,94

Modelo	Alelos/ Genótipo	Infecção acima dos 60 meses		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor ^c
Alélico	G	-		
	A	-	0,48 (0,19-1,04)	0,08
Dominante	GG	10 (66,67%)	1	
	AG+AA	5 (33,33%)	3,24 (0,87-13,87)	0,09
Recessivo	AG + GG	13 (86,67%)	1	
	AA	2 (13,33%)	0,25 (0,33-1,24)	0,12
Aditivo	GG	10 (66,67%)	1	
	AG	3 (20,00%)	0,47 (0,06-3,31)	0,45

AA 2 (13,33%) 0,23 (0,03-1,15) 0,10

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: a: OR – *odds ratio*. b: IC – Intervalo de confiança de 95%. c: regressão logística binomial ajustada para sexo (nível de significância $p < 0,05$).

6.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE RS7512462 (*SLC26A9*) E VARIÁVEIS CLÍNICAS DA FC

Não foram observadas associações significativas entre o polimorfismo rs7512462 e as variáveis clínicas da FC (Tabela 4).

Tabela 4- Associações entre a variante rs7512462 (*SLC26A9*) e variáveis clínicas da FC.

Modelo	Alelos/ Genótipos	Uso de Dornase Alfa			Risco nutricional		
		N	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	G	-	1		-	1	
	A	-	1,06 (0,46 – 2,47)	0,89	-	2,04 (0,83 – 5,51)	0,13
Dominante	GG	10 (32,26%)	1		7 (25,93%)	1	
	AG + AA	21 (67,74%)	1,12 (0,35-3,57)	0,85	20 (74,07%)	0,54 (0,16 – 1,80)	0,32
Recessivo	AG + GG	4 (12,90%)	1		5 (18,52%)	1	
	AA	27 (87,10%)	0,99 (0,20 – 5,48)	0,99	22 (81,48%)	5,00 (0,73 – 99,99)	0,16
Aditivo	GG	10 (32,26%)	1		7 (25,93%)	1	
	AG	17 (54,84%)	1,13 (0,34 – 3,74)	0,84	15 (55,56%)	1,48 (0,43 – 5,25)	0,53
	AA	4 (12,90%)	1,07 (0,18 – 6,78)	0,94	5 (18,52%)	6,43 (0,79 – 138,87)	0,12
Modelo	Alelos/ Genótipos	Sobrepeso			Desnutrição		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	A	-	1		-		
	G	-	1,27 (0,36-4,74)	0,70	-	0,79 (0,21 – 2,79)	0,70
Dominante	GG	2 (25,00%)	1		5 (26,32%)	1	
	AG+AA	6 (75,00%)	0,93 (0,11-5,85)	0,94	14 (73,68%)	1,07 (0,17 – 8,96)	0,94
Recessivo	AG + GG	6 (75,00%)	1		16 (84,21%)	1	
	AA	2(25,00%)	1,78 (0,20 – 13,58)	0,58	3 (15,79%)	0,56 (0,07-5,07)	0,58

Aditivo	GG	2 (25,00%)	1		5 (26,32%)	1	
	AG	4 (50,00%)	0,91 (0,13 - 8,16)	0,93	11 (57,89%)	1,1 (0,12-7,90)	0,93
	AA	2 (25,00%)	1,67 (0,14 - 21,44)	0,68	3 (15,79%)	0,6 (0,05 - 7,33)	0,68
Modelo	Alelos/ Genótipos	Exacerbação pulmonar			Uso de pancreatina		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	G	-	1		-	1	
	A	-	0,49 (0,13 - 1,52)	0,24	-	0,89 (0,33 - 2,45)	0,82
Dominante	GG	4 (44,44%)	1		14 (33,33%)	1	
	AG + AA	5 (55,56%)	0,58 (0,13 - 2,70)	0,47	28 (6,67%)	1 (0,23 - 3,85)	1
Recessivo	AG + GG	-	1		5 (11,90%)	1	
	AA	9 (100%)	-		37 (88,10%)	0,68 (0,12 - 5,20)	0,67
Aditivo	GG	4 (44,44%)	1		14 (33,33%)	1	
	AG	5 (55,56%)	-		23 (54,76%)	1,10 (0,24 - 4,53)	0,90
	AA	-	-		5 (11,90%)	0,71 (0,10 - 6,30)	0,74
Modelo	Alelos/ Genótipos	Uso de Tobramicina inalatória			Infecção por <i>P. aeruginosa</i>		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	G	-	1		-	1	
	A	-	1,12 (0,41 - 3,04)	0,82	-	0,62 (0,26 - 1,37)	0,25
Dominante	GG	4 (33,33%)	1		11 (44,00%)	1	
	AG + AA	8 (66,67%)	1 (0,26 - 4,35)	1	14 (56,00%)	2,06 (0,67 - 6,6)	0,21
Recessivo	AG + GG	2 (16,67%)	1		22 (88,00%)	1	
	AA	10 (83,33%)	1,48 (0,19-8,09)	0,67	3 (12,00%)	0,65 (0,12-2,99)	0,59
Aditivo	GG	4 (33,33%)	1		11 (44,00%)	1	
	AG	6 (50,00%)	0,91 (0,22 - 4,10)	0,90	11 (44,00%)	0,5 (0,15 - 1,63)	0,25
	AA	2 (16,67%)	1,40 (0,16 - 9,88)	0,74	3 (12,00%)	0,43 (0,07 - 2,31)	0,34
Modelo	Alelos/ Genótipos	Infecção até 11 meses e 29 dias			Infecção entre 12 meses e 59 meses e 29 dias		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor	N (%)	OR (IC-95%)	p-valor ^c
Alélico	A	-	1		-	1	
	G	-	0,79 (0,27 - 2,17)	0,65	-	0,89 (0,33 - 2,38)	0,82

Dominante	GG	5 (35,71%)	1		5 (31,25%)	1	
	AG + AA	9 (64,29%)	1,16 (0,29 – 4,36)	0,82	11 (68,75%)	0,86 (0,22 – 3,13)	0,82
Recessivo	AG + GG	13 (92,86%)	1		15 (93,75%)	1	
	AA	1 (7,14%)	0,52 (0,02 – 3,96)	0,57	1 (6,25%)	0,42 (0,02 – 3,15)	0,45
Aditivo	GG	5 (35,71%)	1		5 (31,25%)	1	
	AG	8 (57,14%)	0,94 (0,24-3,85)	0,93	10 (62,50%)	1,33 (0,35 – 5,37)	0,67
	AA	1 (7,14%)	0,50 (0,02-4,65)	0,58	1 (6,25%)	0,50 (0,02 – 4,65)	0,58

Modelo	Alelos/ Genótipos	Infecção acima dos 60 meses		
		N (%)	OR (IC-95%) ^{ab}	p-valor ^c
Alélico	A	-	1,4 (0,52-3,93)	0,50
	G	-		
Dominante	GG	5 (33,33%)	1	
	AG + AA	10 (66,67%)	1 (0,25 – 3,67)	1
Recessivo	AG + GG	12 (80,00%)	1	
	AA	3 (20,00%)	3,5 (0,52 – 29,27)	0,19
Aditivo	GG	5 (33,33%)	1	
	AG	7 (46,67%)	0,78 (0,19-3,23)	0,72
	AA	3 (20,00%)	3,0 (0,38 – 29,17)	0,30

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: a: OR – *odds ratio*. b: IC – Intervalo de confiança de 95%. c: regressão logística binomial (nível de significância $p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que os alelos rs3788766*A (*SLC6A14*) e rs7512462*C (*SLC26A9*) apresentaram as menores frequências entre as amostras com genótipos determinados. Esse resultado diferiu parcialmente daquele encontrado em outro trabalho brasileiro, realizado no estado de São Paulo, cujos alelos de menor frequência foram os rs3788766*G e rs7512462*C, respectivamente⁶⁵. As diferenças étnicas entre as populações analisadas nos dois estudos e o pequeno número de indivíduos incluídos no presente estudo podem ser fatores que influenciaram as diferenças detectadas.

Quanto ao polimorfismo rs28929474, todas as amostras foram 100% homozigotas para o alelo rs28929474*C, o que inviabilizou a pesquisa de associações com as variáveis clínicas estudadas. Entretanto, o alelo rs28929474*T é considerado raro, com frequências pequenas em populações europeias, africanas e latino-americanas⁹¹. No Brasil, o estudo de Russo e colaboradores (2016), que investigou a prevalência da deficiência de AAT e a frequência alélica relacionada a esse fenótipo, em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), observou que o alelo rs28929474*T apresentou frequência de 0,8%⁹².

No presente estudo, o alelo rs3788766*A foi associado a um maior risco nutricional relacionado à obesidade e a um menor risco relacionado à desnutrição. Esses resultados diferem daqueles observados por Pereira e colaboradores (2017), nos quais o alelo rs3788766*A (em homozigose) elevou as chances de redução do IMC⁶⁵. As análises realizadas nas plataformas *HaploReg* e *RegulomeDB* evidenciaram a relação da variante rs3788766 com regiões reguladoras da expressão gênica, inclusive em tecidos relacionados ao intestino. Semelhantemente, Ahmadi e colaboradores⁶⁹ observaram que, em murinos com FC, o silenciamento do gene *SLC6A14* induziu a redução do ganho de peso e do IMC após o desmame. Entretanto, em estudos funcionais, o papel específico de variantes sobre a expressão do *SLC6A14* e, conseqüentemente, sobre o fenótipo nutricional da FC precisa ser mais bem elucidado⁶².

A literatura evidencia a associação entre a variante rs3788766 e parâmetros da doença pulmonar (idade dos primeiros sintomas respiratórios, idade da primeira infecção pulmonar por *P. aeruginosa* e dados funcionais provenientes da espirometria)^{64,65}. No presente trabalho, três variáveis foram utilizadas como marcadores da doença pulmonar

relacionada à FC: o uso clínico da enzima dornase alfa (uma desoxirribonuclease recombinante humana que reduz a viscosidade do muco pela hidrólise do DNA acumulado nas secreções), uso contínuo da tobramicina inalatória e ocorrência de episódios de exacerbação pulmonar. A presença do alelo rs3788766*A diminuiu as chances de uso da dornase alfa e aumentou as chances de ocorrência de exacerbação respiratória. Não foram observadas associações significativas entre esse alelo e o uso contínuo da tobramicina inalatória. Esses resultados conflitantes podem ser atribuídos ao fato de que a doença pulmonar relacionada à FC é progressiva e influenciada pelos processos relacionados ao envelhecimento⁹³. Dessa forma, o número relativamente pequeno de indivíduos que fizeram uso da dornase alfa e da tobramicina inalatória pode decorrer da faixa etária estudada, composta, predominantemente, por crianças. Além disso, fatores ambientais e a adesão ao tratamento, não avaliados no presente estudo, são componentes que apresentam forte influência sobre a doença pulmonar^{44,45}. No estudo de Pereira e colaboradores⁶⁵, a média de idade da primeira infecção por *P. aeruginosa* (80,61 meses) foi superior àquela observada no presente trabalho (54,84 meses). Além disso, aqueles autores observaram que a presença do alelo rs3788766*C (em homozigose) reduziu as chances de infecção respiratória pela cepa mucoide de *P. aeruginosa*. No presente trabalho, não foram evidenciadas associações significativas entre os alelos da variante rs3788766 e a infecção por esse micro-organismo. A baixa proporção de indivíduos cronicamente infectados por essa bactéria, aqui incluídos, pode ter influenciado a discrepância dos resultados. Além disso, o pequeno número de sujeitos infectados inviabilizou a categorização dessa infecção com a cepa mucoide ou não mucoide para as análises estatísticas, o que impossibilita a comparação dos resultados entre os dois estudos.

Estudo prévios demonstraram a associação da variante rs7512462 com marcadores da insuficiência pancreática e do íleo meconial^{64,79}. O uso clínico da pancreatina foi tratado como marcador relacionado à insuficiência pancreática, no presente estudo, mas este não foi associado de maneira significativa com a variante supracitada em qualquer um dos modelos analisados, o que é consoante com a ideia de que o genótipo do gene *CFTR* exerce maior influência sobre o *status* pancreático⁹⁴. O estudo de Bradley e colaboradores⁹⁵ evidenciou que fatores genéticos não relacionados à *CFTR* parecem influenciar a variação do IMC em indivíduos com FC, principalmente genes localizados nos cromossomos 1 e 5. Essa relação não foi aqui observada, uma vez

que os genótipos da variante rs7512462 do gene *SLC26A9*, localizado no cromossomo 1, não foram associados ao risco nutricional. Entretanto, covariáveis consideradas no manuscrito supracitado (sexo, período de nascimento da coorte, idade do diagnóstico da FC, diagnóstico realizado através da triagem neonatal, genótipo, insuficiência pancreática, histórico de íleo meconial, ocorrência de gastrotomia, função pulmonar e marcadores socioeconômicos)⁹⁵ não foram incluídas nas análises estatísticas realizadas nesta pesquisa.

As limitações do trabalho consistiram no pequeno número de indivíduos analisados em uma população predominantemente pediátrica, o que pode ter influenciado a associação com variáveis relacionadas à doença pulmonar e ao estado nutricional. O pequeno número de indivíduos avaliados também pode ter influenciado a não detecção do alelo rs28929474*T, cuja frequência é rara. A heterogeneidade alélica da população incluída prejudicou a inclusão das variantes patogênicas do *CFTR* nas análises estatísticas aqui realizadas. O desenho do estudo, de corte transversal, só permitiu um recorte momentâneo dos dados clínicos dos sujeitos assistidos no ambulatório e impossibilitou o acompanhamento de desfechos que poderiam ser detectados em um estudo longitudinal. Além disso, a disponibilidade de dados funcionais pulmonares foi prejudicada pela faixa etária de cerca de 30% população, já que muitos indivíduos ainda não são aptos para a realização da espirometria e pelas dificuldades decorrentes da pandemia de COVID-19, as quais impactaram na realização do exame em todas as faixas etárias. Apenas uma criança desse estudo apresentou íleo meconial ao nascimento, o que inviabilizou a inclusão dessa variável nas análises estatísticas. Também a ausência de grupo controle impossibilitou estabelecer a frequência das variantes estudadas em populações sem FC e uma melhor interpretação dos resultados obtidos.

8 CONCLUSÕES

1. Os alelos A e C, relacionados às variantes rs3788766 e rs7512462, respectivamente, mostraram-se frequentes na população estudada;
2. A variante rs3788766 foi associada aos marcadores da doença pulmonar (uso de dornase alfa e ocorrência de episódios de exacerbação pulmonar) e, principalmente, ao risco nutricional para sobrepeso e desnutrição.

REFERÊNCIAS

1. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *The Journal of Pediatrics*. 2008; 153(2):S4–14.
2. 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. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007; 6(1):57–65.
3. Scotet V, Gutierrez H, Farrell PM. Newborn Screening for CF across the Globe — Where Is It Worthwhile? *International Journal of Neonatal Screening*. 2020; 6(1):18.
4. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem BS, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991; 10(1):214-28.
5. Rosa FR, Dias FG, Nobre LN, Morais HA. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. *Revista de Nutrição*. 2008; 21(6):725-37.
6. Krasnov KV, Tzetis M, Cheng J, Guggino WB, Cutting GR. Localization studies of rare missense mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) facilitate interpretation of genotype-phenotype relationships. *Human Mutation*. 2008; 29(11):1364-72.
7. Meng X, Clews J, Kargas V, Wang X, Ford RC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(1):23-38
8. Kleizen B, Braakman I, de Jonge HR. Regulated trafficking of the CFTR chloride channel. *European Journal of Cell Biology* 2000; 79(8):544-56.
9. Dalcin PD, Abreu e Silva FA. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2008; 34(2).
10. Reis FJ, Damaceno N. Cystic fibrosis. *Jornal de Pediatria*. 1998; 74(7):76-94.
11. Grupo Brasileiro de Fibrose Cística. Registro Brasileiro de Fibrose Cística: relatório anual de 2019. Disponível em: http://www.gbefc.org.br/ckfinder/userfiles/files/REBRAFC_2019.pdf. Acesso em: Set.2021.
12. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2008; 7(3):179-96.
13. Firmida MC, Marques BL, Costa CH. Fisiopatologia e manifestações clínicas da fibrose cística. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011; 10(4):46-58.
14. Athanazio RA, Silva Filho LVRF, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianoy EDFA, Adde FV, Reis FJC, Ribeiro JD, Torres LA, Fuccio MB, Epifanio M, Firmida MC, Damaceno N, Ludwig-Neto N, Maróstica PJC, Rached SZ, Melo SFO; Grupo de Trabalho das Diretrizes Brasileiras de Diagnóstico e Tratamento da Fibrose Cística. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2017; 43(3):219-45.

15. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ Jr; Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr*. 2007; 151(1):85-9.
16. Athanazio RA, Silva Filho LVRS, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, Procianoy EFA, et al. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. *J Bras Pneumol*. 2017;43(3):219-45.
17. Houlston RS, Tomlinson IP. Modifier genes in humans: strategies for identification. *Eur J Hum Genet*. 1998; 6(1):80-8.
18. Merlo CA, Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med*. 2003; 141(4):237-41
19. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Fibrose cística: veja como é o diagnóstico e o tratamento. Disponível em: <https://sbpt.org.br/portal/publico-geral/fibrose-cistica-diagnostico-tratamento>. Acesso em: 07 Out. 2021.
20. Cabello GMK. Avanços da genética na fibrose cística. *Rev Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2011; 10(4):36-45.
21. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2022; 21(3):456-62
22. Massie RJ, Curnow L, Glazner J, Armstrong DS, Francis I. Lessons learned from 20 years of newborn screening for cystic fibrosis. *Med J Aust*. 2012; 196(1):67-70.
23. Kosorok MR, Wei WH, Farrell PM. The incidence of cystic fibrosis. *Stat Med*. 1996; 15(5):449-62.
24. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009; 373(9678):1891-904
25. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008; 153(2):S4-S14.
26. Scotet V, L'Hostis C, Férec C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the *CFTR* Gene Discovery. *Genes (Basel)*. 2020; 11(6):589
27. Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L, Rosario-Filho NA, Camargo Neto E, Lewis E, Giugliani R, Diniz EM, Culpi L, Phillip JA, Chakraborty R. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del mutation at the *CFTR* gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros*. 2008; 7(1):15-22.
28. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154(5):1229-56.
29. CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Know your *CFTR* mutation infographic. 2021. Disponível em: <https://www.cff.org/Research/Developing-New-Treatments/CFTR-Modulator-Types/>. Acesso em: 07 Out. 2021.
30. Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of *CFTR* mutation classes. *Lancet Respir Med*. 2016; 4(8):e37-e38.

31. Marson FAL. Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2018; 24(3):296-308.
32. Kidd JF, Bear CE. Epithelial cell chloride channel activity correlates with improved airway function in cystic fibrosis patients with the major mutant: Delta F508. *Pediatr Res*. 2002; 52(5):625-7.
33. Kunzelmann K, Schreiber R, Hadorn HB. Bicarbonate in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2017; 16(6):653-66.
34. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005; 352(19):1992–2001.
35. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015; 277(2):155-66.
36. Massip-Copiz MM, Santa-Coloma TA. Extracellular pH and lung infections in cystic fibrosis. *Eur J Cell Biol*. 2018; 97(6):402-10.
37. Kobelksa-Dubiel N, Klineciewicz B, Cichy W. Liver disease in cystic fibrosis. *Prz Gastroenterol*. 2014; 9(3):136-41.
38. Diwakar V, Pearson L, Beath S. Liver disease in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2001; 2:340–9.
39. Fiorotto R, Strazzabosco M. Pathophysiology of Cystic Fibrosis Liver Disease: A Channelopathy Leading to Alterations in Innate Immunity and in Microbiota. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2019; 8(2):197-207.
40. Gelfond D, Borowitz D. Gastrointestinal complications of cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013; 11(4):333-42
41. Strong TV, Boehm K, Collins FS. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J Clin Invest*. 1994; 93(1):347-54.
42. De Lisle RC, Borowitz D. The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(9):a009753.
43. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. Fibrose cística para pacientes e os seus cuidadores. Disponível em: <https://www.nupad.medicina.ufmg.br/wp-content/uploads/2016/12/Fibrose-Cistica-Cartilha-Digital.pdf>. Acesso em: 08 out. 2021.
44. Weiler CA, Drumm ML. Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Front Pharmacol*. 2013; 23:4:40.
45. Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Cutler D, Cutting GR. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175(10):1036-43
46. Dupuis A, Keenan K, Ooi CY, Dorfman R, Sontag MK, Naehrlich L, Castellani C, Strug LJ, Rommens JM, Gonska T. 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.
47. Singh VK, Schwarzenberg SJ. Pancreatic insufficiency in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2017; 16 Suppl 2:S70-S78.

48. Hegyi P, Wilschanski M, Muallem S, Lukacs GL, Sahin-Tóth M, Uc A, Gray MA, Rakonczay Z Jr, Maléth J. CFTR: A New Horizon in the Pathomechanism and Treatment of Pancreatitis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2016; 170:37-66.
49. Colombo C, Crosignani A, Battezzati PM. Liver involvement in cystic fibrosis. *J Hepatol*. 1999; 31(5):946-54.
50. Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B. Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology*. 1999;30(5):1151-8. doi: 10.1002/hep.510300527. PMID: 10534335.
51. Boëlle PY, Debray D, Guillot L, Corvol H; French CF Modifier gene study investigators. SERPINA1 Z allele is associated with cystic fibrosis liver disease. *Genet Med*. 2019; 21(9):2151-5.
52. Milger K, Holdt L, Teupser D, Huber RM, Behr J, Kneidinger N. Identification of a novel SERPINA-1 mutation causing alpha-1 antitrypsin deficiency in a patient with severe bronchiectasis and pulmonary embolism. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10(1):891-7
53. Cammelier AA, Winter DH, Jardim JR, Barboza CEG, Cukier. Alpha-1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment. *J. bras. pneumol*. 2008;34(7): 514-27.
54. Zuo L, Pannell BK, Zhou T, Chuang CC. Historical role of alpha-1-antitrypsin deficiency in respiratory and hepatic complications. *Gene*. 2016;589(2):118-22.
55. Hunt AMD, Glasgow AMA, Humphreys H, Greene CM. Alpha-1 antitrypsin-a target for microrna-based therapeutic development for cystic fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(3):836.
56. Carroll TP, Greene CM, O'Connor CA, Nolan AM, O'Neill SJ, McElvaney NG. Evidence for unfolded protein response activation in monocytes from individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *J Immunol*. 2010; 184(8):4538-46.
57. McKelvey MC, Weldon S, McAuley DF, Mall MA, Taggart CC. Targeting proteases in cystic fibrosis lung disease: Paradigms, progress, and potential. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 201(2):141-7.
58. McElvaney NG. Alpha-1 Antitrypsin therapy in cystic fibrosis and the lung disease associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; Suppl 2:S191-6.
59. Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*. 1992 Jun 18;357(6379):605-7.
60. Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, Castaldo G, Castellani C, Cipolli M, Colombo C, Colombo JL, Debray D, Fernandez A, Lacaille F, Macek M Jr, Rowland M, Salvatore F, Taylor CJ, Wainwright C, Wilschanski M, Zemková D, Hannah WB, Phillips MJ, Corey M, Zielenski J, Dorfman R, Wang Y, Zou F, Silverman LM, Drumm ML, Wright FA, Lange EM, Durie PR, Knowles MR Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA*. 2009; 302(10):1076-83.
61. Mueller C, Tang Q, Gruntman A, Blomenkamp K, Teckman J, Song L, Zamore PD, Flotte TR. Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles. *Mol Ther*. 2012; 20(3):590-600.

62. Ruffin M, Mercier J, Calmel C, Mésinè J, Bigot J, Sutanto EN, Kicic A, Corvol H, Guillot L. Update on SLC6A14 in lung and gastrointestinal physiology and physiopathology: focus on cystic fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2020; 77(17):3311-23.
63. Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X, Chiang TA, Lin F, Dorfman R, Busson PF, Parekh RV, Zelenika D, Blackman SM, Corey M, Doshi VK, Henderson L, Naughton KM, O'Neal WK, Pace RG, Stonebraker JR, Wood SD, Wright FA, Zielenski J, Clement A, Drumm ML, Boëlle PY, Cutting GR, Knowles MR, Durie PR, Strug LJ. Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet.* 2012; 44(5):562-9.
64. Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F, Gong J, Chiang T, Stephenson AL, Durie P, Rommens J, Sun L, Strug LJ. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet.* 2014; 133(2):151-61.
65. 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.
66. Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2018; 53(7):888-900.
67. Galiotta LJ, Musante L, Romio L, Caruso U, Fantasia A, Gazzolo A, Romano L, Sacco O, Rossi GA, Varesio L, Zegarra-Moran O. An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998; 275(5):L917-23.
68. Di Paola M, Park AJ, Ahmadi S, Roach EJ, Wu YS, Struder-Kypke M, Lam JS, Bear CE, Khursigara CM. *SLC6A14* Is a genetic modifier of cystic fibrosis that regulates *Pseudomonas aeruginosa* attachment to human bronchial epithelial cells. *mBio.* 2017; 8(6):e02073-17.
69. Ahmadi S, Xia S, Wu YS, Di Paola M, Kissoon R, Luk C, Lin F, Du K, Rommens J, Bear CE. SLC6A14, an amino acid transporter, modifies the primary CF defect in fluid secretion. *Elife.* 2018; 7:e37963.
70. NCBI. Gene *SLC26A9*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/115019>. Acesso em: 27 abr. 2020.
71. Geertsma ER, Chang YN, Shaik FR, Neldner Y, Pardon E, Steyaert J, Dutzler R. Structure of a prokaryotic fumarate transporter reveals the architecture of the SLC26 family. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22(10):803-8.
72. Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M, Seidler U, Kere J. Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003; 284(3):C769-79.
73. Chang MH, Plata C, Zandi-Nejad K, Sindić A, Sussman CR, Mercado A, Broumand V, Raghuram V, Mount DB, Romero MF. Slc26a9--anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J Membr Biol.* 2009; 228(3):125-40.

74. Liu X, Li T, Riederer B, Lenzen H, Ludolph L, Yeruva S, Tuo B, Soleimani M, Seidler U. Loss of Slc26a9 anion transporter alters intestinal electrolyte and HCO₃⁻ transport and reduces survival in CFTR-deficient mice. *Pflugers Arch.* 2015; 467(6):1261-75.
75. Walter JD, Sawicka M, Dutzler R. Cryo-EM structures and functional characterization of murine Slc26a9 reveal mechanism of uncoupled chloride transport. *Elife.* 2019; 8:e46986.
76. Balázs A, Mall MA. Role of the SLC26A9 Chloride Channel as Disease Modifier and Potential Therapeutic Target in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018; 9:1112.
77. El Khouri E, Touré A. Functional interaction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with members of the SLC26 family of anion transporters (SLC26A8 and SLC26A9): physiological and pathophysiological relevance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 52:58-67.
78. Bertrand CA, Zhang R, Pilewski JM, Frizzell RA. SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia. *J Gen Physiol.* 2009; 133(4):421-38.
79. Miller MR, Soave D, Li W, Gong J, Pace RG, Boëlle PY, Cutting GR, Drumm ML, Knowles MR, Sun L, Rommens JM, Accurso F, Durie PR, Corvol H, Levy H, Sontag MK, Strug LJ. Variants in solute carrier SLC26A9 modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J Pediatr.* 2015; 166(5):1152-7.e6.
80. Lam AN, Aksit MA, Vecchio-Pagan B, Shelton CA, Osorio DL, Anzmann AF, Goff LA, Whitcomb DC, Blackman SM, Cutting GR. Increased expression of anion transporter SLC26A9 delays diabetes onset in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 2020; 130(1):272-86.
81. Corvol H, Mésinè J, Douksieh IH, Strug LJ, Boëlle PY, Guillot L. *SLC26A9* gene is associated with lung function response to ivacaftor in patients with cystic fibrosis. *Front Pharmacol.* 2018; 9:828.
82. Kmit A, Marson FAL, Pereira SV, Vinagre AM, Leite GS, Servidoni MF, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Bertuzzo CS, Amaral MD. Extent of rescue of F508del-CFTR function by VX-809 and VX-770 in human nasal epithelial cells correlates with SNP rs7512462 in SLC26A9 gene in F508del/F508del Cystic Fibrosis patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019; 1865(6):1323-31
83. Bińkowski J., Miks S. Gene-Calc [Computer software]. [2018, Sep.]. Available from: www.gene-calc.pl.
84. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Database issue): D930-4.
85. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012; 22(9):1790-7.
86. Mishra P, Pandey CM, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth.* 2019; 22(1):67-72.
87. WHO. Anthro for personal computers, version 3.2.2, 2011: Software for assessing growth and development of the world's children. Geneva: WHO, 2010. Disponível em:<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>.

88. WHO. AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. Geneva: WHO, 2009 (<https://www.who.int/tools/growth-reference-datafor-5to19-years>).
89. BMI for age. Disponível em: <https://www.who.int/toolkits/child-growth-standards/standards/body-mass-index-for-age-bmi-for-age>. Acesso em: 10 Jul. 2022.
90. BMI for age (5-19 years). <https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years/indicators/bmi-for-age>. Disponível em: <https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years/indicators/bmi-for-age>. Acesso em: 10 Jul. 2022.
91. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(1):308-11.
92. Russo R, Zillmer LR, Nascimento OA, Manzano B, Ivanaga IT, Fritscher L, Lundgren F, Miravittles M, Gondim HD, Santos G Junior, Alves MA, Oliveira MV, Souza AA, Sales MP, Jardim JR. Prevalence of alpha-1 antitrypsin deficiency and allele frequency in patients with COPD in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2016; 42(5):311-16.
93. Künzi L, Easter M, Hirsch MJ, Krick S. Cystic Fibrosis Lung Disease in the Aging Population. *Front Pharmacol.* 2021; 12:601438.
94. Marson FAL. Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2018; 24(3):296-308.
95. Bradley GM, Blackman SM, Watson CP, Doshi VK, Cutting GR. Genetic modifiers of nutritional status in cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(6):1299-308.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentado aos participantes da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO

Estudo clínico-epidemiológico da Fibrose Cística em um Centro Universitário de referência em Salvador, Bahia.

Você está sendo convidado(a) a participação de uma pesquisa. Antes de decidir participar, é importante que entenda o porquê a pesquisa está sendo realizada e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler cuidadosamente as informações seguintes. Pergunte-nos se houver qualquer coisa que não esteja clara ou se você precisar de mais informações. Utilize o tempo que for necessário para decidir se deseja participar do estudo.

O estudo dedica-se a descrever os dados clínicos – epidemiológicos dos pacientes acompanhados no ambulatório de fibrose cística no AMN (Ambulatório Magalhães Neto) durante o período de agosto de 2012 a dezembro de 2022.

Serão convidados os pacientes que apresentarem o diagnóstico da fibrose cística confirmado e aqueles que ainda estão em investigação. Você pode ou não participar da pesquisa. Se quiser participar, você deverá assinar e rubricar o formulário em todas as suas páginas, este formulário, sendo que este deve ser preenchido em duas vias, uma que ficará em poder do responsável pela pesquisa (que também assinará o formulário), e outra que será mantida com você. Se decidir participar, mas mudar de ideia durante a pesquisa, você poderá sair a qualquer momento sem se desculpar. Isto não afetará o cuidado e a atenção que seu médico tem dado a você.

O estudo ocorrerá durante a consulta do paciente, serão utilizados os dados presentes no prontuário do paciente ou obtidos durante o atendimento.

Serão coletados seus dados como: idade que realizou o teste do pezinho, idade em que fez o teste do suor, idade em que confirmou diagnóstico, sintomas à admissão no Centro de Tratamento, sexo, dados do nascimento (peso ao nascimento, tipo de parto, local do parto, tempo na maternidade, complicações neonatais), peso e estatura à admissão no Centro de Tratamento e em cada consulta, resultado de exames como testes para avaliar insuficiência pancreática (elastase fecal, esteatócrito, Van de Kammer), alterações na radiografia ou na tomografia do tórax, presença de microorganismos na cultura do escarro, etc. Você será acompanhado no ambulatório de FC e em cada consulta serão coletados os dados clínicos- laboratoriais e serão anotadas as alterações ocorridas neste período, como evolução clínica, complicações, alterações na radiografia ou na tomografia de tórax, colonização por bactérias nas culturas de escarro, resultados de exames laboratoriais, infecções respiratórias, internações, necessidade de hospitalização e adesão ao tratamento.

Se você concordar em participar deste estudo, será coletada uma amostra de sangue do seu antebraço, com uma agulha nova e descartável, após assepsia local (limpeza). A coleta poderá gerar um desconforto ao paciente. A amostra de sangue será dividida em duas alíquotas: uma parte será enviada ao Laboratório de Genética Humana e Mutagenese do Instituto de Biologia da UFBA, sob a responsabilidade da profa. Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima, onde haverá extração de DNA (material genético) que será utilizado para a pesquisa de mutações genéticas relacionadas com a fibrose cística; a outra parte será enviada ao Laboratório de Inflamação e Biomarcadores da FIOCRUZ (IGM-

Bahia), sob responsabilidade do professor Bruno de Bezerril Andrade, onde será utilizada para a avaliação do perfil inflamatório sistêmico e de remodelamento tecidual a partir de análise proteômica. Para obtenção do material genético, poderá ainda, ser coletada uma amostra da mucosa bucal, realizada com um swab novo e descartável, após assepsia local (limpeza) e, portanto, com mínimos riscos. Esse material coletado será enviado para São Paulo, para o laboratório Mendelics (endereço: Rua Cubatão, 86, cj 1202 - São Paulo/SP - 04013-000), que realizará o exame. Conhecer a mutação genética e o perfil inflamatório sistêmico em cada paciente com fibrose cística pode ajudar a entender melhor a doença em cada pessoa. Está sendo solicitada a sua permissão para estocagem da amostra de DNA no Laboratório de Genética Humana e Mutagênese do Instituto de Biologia da UFBA sob responsabilidade da Profa. Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima. Se assinar este termo de consentimento, você está autorizando a estocagem da amostra de DNA no período de desenvolvimento do projeto, sendo o prazo máximo de 10 anos. As amostras estocadas poderão ser usadas para pesquisas de outras mutações da fibrose cística ou para estudos adicionais da variabilidade genética da FC. Nenhuma outra doença será investigada. O uso da sua amostra estocada para um novo estudo terá como condição uma nova avaliação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética. Não haverá estocagem da amostra coletada a partir da mucosa oral e da alíquota de sangue para estudo do perfil inflamatório sistêmico.

Leia atentamente, as opções abaixo e assinale apenas uma das alternativas, de forma a esclarecer sua vontade em relação à utilização da amostra estocada para novas pesquisas:

Eu quero ser consultado caso novas pesquisas com o material genético armazenado seja realizada e então, assinar ou não o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

Eu concordo que o material genético armazenado seja utilizado em novas pesquisas sem a necessidade de assinar novos termos, uma vez que autorizo, desde agora, a utilização deste material em futuras pesquisas.

A sua participação é importante, pois ajudará a entender melhor a Fibrose Cística, permitindo que os médicos ampliem seu conhecimento sobre esta doença e com isso possam cuidar melhor dos pacientes com Fibrose cística.

Ao término deste estudo, você continuará o acompanhamento regular no próprio ambulatório.

Todas as informações coletadas sobre você durante a pesquisa serão mantidas em sigilo. Qualquer informação sua que saia do hospital terá seu nome e endereço removidos, de forma que não poderá ser identificado (a). Ao término deste estudo, os dados coletados serão usados para publicação de artigos científicos.

Os investigadores não serão remunerados para a realização desse estudo, assim como os pacientes voluntários também não serão remunerados para a sua participação no mesmo.

Qualquer dúvida que lhe ocorra ao decorrer deste estudo, você poderá contactar com a Prof^ª. Dr^ª Edna Lúcia Souza pelo telefone (71) 3283- 8333 ou no Serviço de Pneumologia Pediátrica no Ambulatório Magalhães Neto (Rua Padre Feijó, 240, canela, Salvador/BA). Você pode também entrar em contato com o Comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (Rua Dr. Augusto Viana, S/n - Canela, Salvador /BA) pelo telefone (71) 3283 8043. Os resultados serão disponibilizados ao participante por membros da equipe do projeto e/ou pelo Serviço de Pneumologia Pediátrica no Ambulatório Magalhães Neto, que deverá esclarecer dúvidas e, se for o caso, realizar aconselhamento genético.

Ao assinar este termo, você declarará que sua participação no estudo é voluntária. Você também estará esclarecido (a) de que sua recusa em participar do estudo ou sua

desistência no curso do mesmo não afetará na qualidade e a disponibilidade da assistência médica será prestada. Você receberá uma via assinada e datada deste consentimento e declara que suas dúvidas foram esclarecidas de maneira satisfatória e em linguagem de fácil entendimento. Todas as páginas do termo deverão ser rubricadas pelo convidado ou por seu representante legal.

NO CASO DE VOCÊ TER DIFICULDADE PARA LER (☐Sim ou Não ☐), O ESCRITO ACIMA, DEVE ATESTAR TAMBÉM QUE O(A) PESQUISADOR(A)....., QUANDO DA LEITURA PAUSADA DESSE DOCUMENTO, ESCLARECEU TODAS SUAS DÚVIDAS E PARA CONCORDAR EM PARTICIPAR DO ESTUDO, VOCÊ DEVERÁ COLOCAR ABAIXO A IMPRESSÃO DO SEU DEDO POLEGAR.


Nome do(a) Paciente	Assinatura ou Impressão Digital	Data
---------------------	---------------------------------	------

Nome do(a) Representante	Assinatura	Data
--------------------------	------------	------

Pessoa que apresentou a pesquisa se não for o investigador principal	Assinatura	Data
--	------------	------

Nome do Investigador principal	Assinatura	Data
--------------------------------	------------	------

ANEXO B – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

<p>HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA - HUPES</p> 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Estudo clínico-epidemiológico da fibrose cística em um centro universitário de referência em Salvador, BA.								
Pesquisador: Edna Souza								
Área Temática: Genética Humana; (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);								
Versão: 1								
CAAE: 58704316.0.0000.0049								
Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA								
Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.759.008								
Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo observacional, longitudinal, descritivo, que irá descrever os dados clínico-epidemiológicos de crianças diagnosticadas com Fibrose Cística (FC) e acompanhadas no Serviço de Pneumologia Pediátrica do CPPHO/HUPES/UFBA entre 2005 e 2015, com foco na evolução clínico-laboratorial no período de um ano após admissão no estudo. Para isso, serão coletados dados em entrevista com responsáveis pelas crianças, em prontuário, além de coleta de material biológico para exames de controle de colonização por bactérias (cultura de secreção de VAS), exames de imagem (Rx de tórax e Tomografias de face e/ou tórax) e DNA para identificação das mutações no gene da CFTR, a serem realizadas no Instituto de Biologia da UFBA. Há um TCLE para ser aplicado, no qual há a informação acerca da escolha do responsável sobre a possibilidade de armazenamento do material durante o estudo, caracterizando um biorrepositório.								
Objetivo da Pesquisa: Objetivo Primário: Descrever os dados clínico-epidemiológicos da fibrose cística entre as crianças diagnosticadas, no CPPHO entre 2005 e 2015 e observar sua evolução no período de um ano após admissão no								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar</td> <td style="border: none;">CEP: 40.110-060</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Caneta</td> <td style="border: none;">Município: SALVADOR</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: BA</td> <td style="border: none;">E-mail: cep.hupes@gmail.com</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (71)3283-8043</td> <td style="border: none;">Fax: (71)3283-8140</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar	CEP: 40.110-060	Bairro: Caneta	Município: SALVADOR	UF: BA	E-mail: cep.hupes@gmail.com	Telefone: (71)3283-8043	Fax: (71)3283-8140
Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar	CEP: 40.110-060							
Bairro: Caneta	Município: SALVADOR							
UF: BA	E-mail: cep.hupes@gmail.com							
Telefone: (71)3283-8043	Fax: (71)3283-8140							

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.759.068

estudo;

Objetivos Secundários:

- Identificar a idade do diagnóstico da doença; Determinar as principais manifestações clínicas que motivaram o diagnóstico; Identificar a idade do início dos primeiros sintomas, determinando o tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico dos pacientes estudados;
- Avaliar a função pulmonar nas crianças maiores de 5 anos;
- Pesquisar a ocorrência de colonização bacteriana do trato respiratório pelos principais patógenos associados à Fibrose Cística, nas crianças acompanhadas;
- Determinar o Score de Shwachman à época do diagnóstico, da admissão do estudo e após um ano de acompanhamento;
- Pesquisar a ocorrência das principais mutações genéticas relacionadas a Fibrose Cística na população estudada;
- Determinar o estado nutricional do paciente em 3 momentos: à época do diagnóstico, na admissão do estudo e após um ano de acompanhamento;
- Determinar as principais manifestações otorrinolaringológicas em crianças com fibrose cística;
- Pesquisar a ocorrência de insuficiência pancreática através da dosagem da elastase fecal, nos pacientes incluídos no estudo;
- Descrever o perfil dos pacientes com doença hepatobiliar relacionada à fibrose cística nas crianças acompanhadas;
- Determinar a frequência de doença hepatobiliar relacionada a fibrose cística na população estudada;

Endereço: Rua Augusto Vieira, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-080
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.759.066

- Comparar as características clínicas e laboratoriais e a frequência das mutações genéticas entre o grupo de fibroclísticos com e sem doença hepatobiliar;

- Identificar possíveis fatores associados à manifestação da doença hepatobiliar em pacientes com fibrose cística.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, segundo os pesquisadores, são "Mínimos, Inerentes a punção venosa periférica". No TCLE, citam que "durante a coleta de sangue, você poderá haver desconforto temporário devido à introdução da agulha. A coleta de sangue poderá resultar em uma pequena lesão que quase sempre cura-se sozinha. Em raros casos, pode ocorrer infecção localizada".

Como benefícios, são referidos "conhecimento clínico epidemiológico da doença, direcionar terapêutica e estimar prognóstico".

Adiciona-se aos riscos o fato da quebra de sigilo dos dados, a necessidade de uso inadequado do material genético extraído e armazenado, mas os pesquisadores garantem que as amostras só serão "usadas para pesquisas de outras mutações da fibrose cística ou para estudos adicionais da variabilidade genética da FC. Nenhuma outra doença será investigada". Também garantem que "caso haja necessidade de transferência do material biológico armazenado para outra instituição, esta mudança lhe será comunicada, sempre que possível. Na impossibilidade desta comunicação, os pesquisadores apresentarão justificativa ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. Você também será informado caso haja perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como encerramento da estocagem das amostras".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um pesquisa necessária, pois possibilitará aos médicos e pacientes/família conhecer com maior grau de detalhamento o perfil genético da FC de cada criança/adolescente. Atualmente, o estudo mutacional na FC pode garantir complementação terapêutica com medicações direcionadas a determinados tipos de mutação e novos estudo parecem poder potencializar essa terapêutica em breve. Isso torna extremamente benéfico ao paciente e sua família obter o conhecimento da mutação genética, pois pode produzir um benefício futuro. Considerando que o serviço mantém o paciente em acompanhamento até um evento ruptivo (morte, transferência) por se tratar de uma doença crônica, o protocolo deve ser executado.

Endereço: Rua Augusto Vieira, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.759.068

Contudo, segundo define a Resolução 441/2013, biorepositório corresponde a "coleção de material biológico humano, coletado e armazenado AO LONGO DA EXECUÇÃO (destaque nosso) de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais". Desta forma, os trechos descritos no TCLE, a seguir transcrito, irá caracterizar a proposta dos pesquisadores como a de um Biobanco, pois afirmam que "se assinar este termo de consentimento, você está autorizando estocagem em longo prazo da amostra de DNA. A amostra de DNA será mantida indefinidamente. Isto significa que a amostra não será destruída após um determinado período de tempo, mas será estocada pelo tempo que ela durar". Essa frase sugere que o tempo de armazenamento da amostra pode extrapolar o tempo de execução do protocolo.

Assim, é fundamental aos pesquisadores considerar o prolongamento do tempo de execução, projetando neste prazo o tempo suficiente para conseguir os recursos necessários (financeiros, pessoais, operacionais) para atingir os objetivos pretendidos de identificar ao máximo os genótipos dos participantes da pesquisa, tendo em vista os potenciais benefícios possíveis com esse diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos incluem a aprovação do projeto original e das emendas apresentadas anteriores ao uso da Plataforma Brasil (PB). Folha de rosto e TCLE se encontram anexados. Adicionalmente, há um documento referindo um recurso de uma emenda que foi deferida como "não aprovada" de maneira equivocada, mas a pesquisadora responsável não conseguiu emitir recurso via PB, sendo feito a análise do recurso por meio exterior a PB com o compromisso do pesquisador responsável de envio de novo projeto para correção e registro na PB do ocorrido.

Recomendações:

Emitir uma nova emenda de prorrogação de prazo caso as mutações previstas ainda não tenham sido realizadas, uma vez que a coleta de dados, segundo o cronograma apresentado se encerra em 30/12/2016.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto encaminhado a PB para ajuste de emenda que necessitou de recurso e não foi possível de ser realizada pela Plataforma, sendo este parecer emitido para certificar da correção ética do

Endereço: Rua Augusto Vieira, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: osp.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.759.066

processo, descrito por meio dos documentos anexados.

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_688581.pdf	11/08/2016 14:55:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	06/08/2016 10:16:09	Edna Souza	Aceito

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Castelo CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
 PROF. EDGARD SANTOS-
 UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.759.068

Ausência	TCLE.pdf	06/08/2016 10:16:09	Edna Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	06/08/2016 10:15:51	Edna Souza	Aceito
Outros	13.pdf	06/08/2016 10:04:47	Edna Souza	Aceito
Outros	12.pdf	06/08/2016 10:04:29	Edna Souza	Aceito
Outros	11.pdf	06/08/2016 10:04:03	Edna Souza	Aceito
Outros	10.pdf	06/08/2016 10:03:09	Edna Souza	Aceito
Outros	9.pdf	06/08/2016 10:02:39	Edna Souza	Aceito
Outros	8.pdf	06/08/2016 10:02:11	Edna Souza	Aceito
Outros	7.pdf	06/08/2016 10:01:49	Edna Souza	Aceito
Outros	6.pdf	06/08/2016 10:01:26	Edna Souza	Aceito
Outros	5.pdf	06/08/2016 10:01:07	Edna Souza	Aceito
Outros	4.pdf	06/08/2016 10:00:47	Edna Souza	Aceito
Outros	3.pdf	06/08/2016 10:00:28	Edna Souza	Aceito
Outros	2.pdf	06/08/2016 10:00:08	Edna Souza	Aceito
Outros	1.pdf	06/08/2016 09:58:33	Edna Souza	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	06/08/2016 09:57:44	Edna Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 04 de Outubro de 2016

Assinado por:
REGINA SANTOS
 (Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA - HUPES/UFBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo clínico-epidemiológico da fibrose cística em um centro universitário de referência em Salvador, BA.

Pesquisador: Edna Souza

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 12

CAAE: 58704316.0.0000.0049

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.287.108

Apresentação do Projeto:

Parecer referente a solicitação de EMENDA para extensão de cronograma, inclusão de pesquisadores e inclusão de objetivos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS APROVADOS NO PROTOCOLO ORIGINAL:

Objetivo Primário:

Descrever os dados clínico-epidemiológicos da fibrose cística entre as crianças diagnosticadas, no CPPHO entre 2005 e 2020 e observar sua evolução no período de um ano após admissão no estudo.

Objetivo Secundário:

- 1) Identificar a idade do diagnóstico da doença;
- 2) Determinar as principais manifestações clínicas que motivaram o diagnóstico;
- 3) Identificar a idade do início dos primeiros sintomas, determinando o tempo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico dos pacientes estudados;

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@ufba.br

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA & HUPES/UFBA



Continuação do Parecer: 5.207.100

- 4) Avaliar a função pulmonar nas crianças maiores de 5 anos;
- 5) Pesquisar a ocorrência de colonização bacteriana do trato respiratório pelos principais patógenos associados à Fibrose Cística, nas crianças acompanhadas;
- 6) Determinar o Score de Shwachman à época do diagnóstico, da admissão do estudo e após um ano de acompanhamento;
- 7) Pesquisar a ocorrência das principais mutações genéticas relacionadas a Fibrose Cística na população estudada;
- 8) Determinar o estado nutricional do paciente em 3 momentos: à época do diagnóstico, na admissão do estudo e após um ano de acompanhamento;
- 9) Determinar as principais manifestações otorinolaringológicas em crianças com fibrose cística;
- 10) Pesquisar a ocorrência de insuficiência pancreática através da dosagem da elastase fecal, nos pacientes incluídos no estudo; Descrever o perfil dos pacientes com doença hepatobiliar relacionada à fibrose cística nas crianças acompanhadas;
- 11) Determinar a frequência de doença hepatobiliar relacionada à fibrose cística na população estudada;
- 12) Comparar as características clínicas e laboratoriais e a frequência das mutações genéticas entre o grupo de fibrocísticos com e sem doença hepatobiliar;
- 13) Identificar possíveis fatores associados à manifestação da doença hepatobiliar em pacientes com fibrose cística.
- 14) Pesquisar a ocorrência de insuficiência pancreática através da dosagem da gordura fecal de 72 h nos pacientes cujo resultado da dosagem da elastase fecal foi normal ou que não a realizaram;
- 15) Avaliar o perfil inflamatório sistêmico e de remodelamento tecidual a partir de análise proteômica;
- 16) Pesquisar genes candidatados a modificadores da FC.

OBJETIVOS A SEREM INSERIDOS PELA EMENDA

1. Levantamento dos custos diretos e indiretos associados ao processo de diagnóstico e do tratamento da fibrose cística;
2. Comparação da efetividade da terapêutica entre os indivíduos diagnosticados através da triagem neonatal com e aqueles com diagnóstico com base nas manifestações;
3. Revisão dos dados referentes à ocorrência da síndrome de Pseudo-Bartter ao diagnóstico da FC

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@ufba.br

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA e HUPES/UFBA



Continuação do Parecer: 5.267.106

ou no curso do acompanhamento;

4. Verificação da correlação entre o Teste de Sentar-Levantar (TSL) 5 repetições e o Teste de Caminhada de 2 minutos (TC2) em indivíduos com FC;
5. Determinação do perfil funcional entre os diferentes genótipos de indivíduos com FC;
6. Avaliação da associação entre qualidade de vida, sono e capacidade funcional entre os indivíduos com FC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide protocolo principal. A Emenda não altera os riscos e benefícios previamente identificados, dado que não houve mudanças na metodologia e ou procedimentos vinculados ao protocolo original

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisadora solicita as seguintes alterações no protocolo atualmente aprovado:

1. Ampliação do prazo para a coleta dos dados, permitindo a inclusão de novos pacientes até dezembro 2024, com conclusão da pesquisa até 31 de dezembro de 2026
2. Inclusão da professora doutora Regina Terse Trindade Ramos;
3. Inclusão dos acadêmicos da Faculdade de Medicina da Bahia (FAMEB/UFBA): Maria Theresa Corrêa Evangelista, Laís Helena de Andrade, Gabriel Souza Medrado Nunes, Victor Vitor Hugo Valença Bomfim, na equipe do estudo (termos de compromisso dos pesquisadores em anexo), além de permitir que os estudantes utilizem parte dos dados na redação de suas monografias de conclusão do curso;
4. Inclusão da doutoranda Adriana Virginia Barros Falçai (Programa Medicina e Saúde/UFBA) e da mestranda Juliana Cane Brazil Costa (Programa de Pós-Graduação em Processos Integrativos de Órgãos e Sistemas/UFBA), além de permitir que utilizem parte dos dados na redação de seus trabalhos de pós-graduação;
5. Inclusão dos seguintes objetivos:

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cap.hupes@ufba.br

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA e HUPES/UFBA



Continuação do Parecer: 5.287.158

1. Levantamento dos custos diretos e indiretos associados ao processo de diagnóstico e do tratamento da fibrose cística;

2. Comparação da efetividade da terapêutica entre os indivíduos diagnosticados através da triagem neonatal com e aqueles com diagnóstico com base nas manifestações;

3. Revisão dos dados referentes à ocorrência da síndrome de Pseudo-Barter ao diagnóstico da FC ou no curso do acompanhamento;

4. Verificação da correlação entre o Teste de Sentar-Levantar (TSL) 5 repetições e o Teste de Caminhada de 2 minutos (TC2) em indivíduos com FC;

5. Determinação do perfil funcional entre os diferentes genótipos de indivíduos com FC; 6. Avaliação da associação entre qualidade de vida, sono e capacidade funcional entre os indivíduos com FC

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadora incluiu os seguintes documentos referente as emendas solicitadas:

Carta de emenda identificando as partes do protocolo a serem alterados;

Termos de compromisso de todos os pesquisadores a serem incluídos no estudo;

Informações básicas com data de cronograma atualizada;

Projeto atualizado com as alterações em destaque, incluindo os métodos para alcance dos novos objetivos; TCLE's atualizados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a emenda foi apresentada de forma clara, sucinta, sendo indicada a parte do protocolo a ser modificada, não descaracterizando o estudo originalmente proposto, conforme orienta a Norma Operacional nº001/2013 e que as justificativas apresentadas foram aceitas por este comitê, considera-se EMENDA APROVADA.

Endereço: Rua Augusto Vieira, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-080
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@ufba.br

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA e HUPES/UFBA



Continuação do Parecer: 5.287.108

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, completamente assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_190611_9_ES.pdf	02/03/2022 21:00:26		Aceito
Outros	TCI_Vitor_Hugo.pdf	01/03/2022 11:36:57	Edna Souza	Aceito
Outros	TCI_Regina.jpg	01/03/2022 11:36:43	Edna Souza	Aceito
Outros	TCI_Maria_Theresa.pdf	01/03/2022 11:36:31	Edna Souza	Aceito

Endereço: Rua Augusto Wien, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-080
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@ufba.br

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA & HUPES/UFBA



Continuação do Parecer: 5.267.106

Outros	12.pdf	06/08/2016 10:04:29	Edna Souza	Aceito
Outros	11.pdf	06/08/2016 10:04:03	Edna Souza	Aceito
Outros	10.pdf	06/08/2016 10:03:09	Edna Souza	Aceito
Outros	9.pdf	06/08/2016 10:02:39	Edna Souza	Aceito
Outros	8.pdf	06/08/2016 10:02:11	Edna Souza	Aceito
Outros	7.pdf	06/08/2016 10:01:49	Edna Souza	Aceito
Outros	6.pdf	06/08/2016 10:01:26	Edna Souza	Aceito
Outros	5.pdf	06/08/2016 10:01:07	Edna Souza	Aceito
Outros	4.pdf	06/08/2016 10:00:47	Edna Souza	Aceito
Outros	3.pdf	06/08/2016 10:00:28	Edna Souza	Aceito
Outros	2.pdf	06/08/2016 10:00:08	Edna Souza	Aceito
Outros	1.pdf	06/08/2016 09:58:33	Edna Souza	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	06/08/2016 09:57:44	Edna Souza	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SALVADOR, 11 de Março de 2022

Assinado por:
Pablo de Moura Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-050
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: csp.hupes@ufba.br



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-10
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>