

Laís Ribeiro Mota

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



**PERFIL GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA DA FIBROSE CÍSTICA EM
UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA.**

**Salvador
2019**

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

Laís Ribeiro Mota

**PERFIL GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA
DA FIBROSE CÍSTICA EM POPULAÇÃO MISCIGENADA.**

Salvador

2019

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

Laís Ribeiro Mota

**PERFIL GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA
DA FIBROSE CÍSTICA EM POPULAÇÃO MISCIGENADA.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Betânia PereiraTorales

Co-orientadora: Prof^aDr^a. Edna Lúcia Souza

Salvador

2019

Ficha Catalográfica:

Ribeiro Mota, Laís

Perfil genético e caracterização fenotípica da fibrose cística em uma população miscigenada / Laís Ribeiro Mota. -- Salvador, 2019.

162f.:il

Orientadora: Maria Betânia Pereira Toralles.

Coorientadora: Edna Lúcia Souza.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2019.

1. Fibrose Cística. 2. Genética. 3. Genótipo. 4. Fenótipo. 5. Regulador de Condutância Transmembrânica em Fibrose Cística. I. Betânia Pereira Toralles, Maria.

II. Souza, Edna Lúcia. III. Título.

Laís Ribeiro Mota

**PERFIL GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA
FIBROSE CÍSTICA EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Processos interativos dos órgãos e sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em, Salvador, 20 de Dezembro de 2019.

Banca Examinadora

Edna Lúcia Souza, Coorientadora _____

Doutora em Medicina e Saúde, pela Universidade Federal da Bahia

Fernando Augusto de Lima Marson _____

Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, pela Universidade Estadual de Campinas

Regina Terse Trindade Ramos _____

Doutora em Medicina e Saúde Humana, pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Almério de Souza Machado Júnior

Doutor em Medicina Interna, pela Fundação Bahiana Para Desenvolvimento das Ciências

Acacia Fernandes Lacerda de Carvalho _____

Doutora em Morfologia, pela Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho

Aos pacientes com fibrose cística e seus familiares.

O meu respeito por sua luta e credibilidade que possibilitaram a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (Antoine de Saint-Exupery).

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me honrado com este título.

Um agradecimento mais que especial para minha orientadora, Prof^a. Dra. Edna Lúcia Souza, por ser fonte de inspiração não só na vida acadêmica e profissional, mas pessoal também. Grande exemplo de generosidade, com quem aprendo só de observar seu atendimento que vai além de humanizado, é maternal.

Obrigada por dividir conosco seu conhecimento, sua ética, sua humildade e seus conselhos durante esses anos juntas.

Nem tudo foi tão fácil, pois ser pesquisador no Brasil não é nada fácil, mas também nunca desistimos e seguiremos!

Aprendi com a senhora que, de que nada adianta o saber, se ele não está a serviço da sociedade. E que o universo retribui... Muito, muito, muito obrigada por tudo e a Deus por ter colocado a senhora nessa minha caminhada.

À Prof^a. Dr^a Maria Betânia Pereira Toralles, uma referência de profissional, comprometida com o bem estar do paciente, por ter aceitado a orientação e acreditado em mim e na possibilidade da realização deste trabalho.

À minha, sempre orientadora, minha mãe científica, Prof^a. Dra. Renata Lima, minha sincera admiração, e por tudo... Muito obrigada!.

A equipe do AMFC, Dr^a Tati, Dr^a Regi, Dr^a Virginia, as residentes, Joyce e especialmente a Marlene, todas extremamente dedicadas aos pacientes.

A todos os alunos bolsistas que já passaram pelo grupo de pesquisa (Valmis, Lore, Bia, Palomita, Muri, Hort, Lucas) pela grande ajuda recebida. O comprometimento de cada um de vocês faz com que a equipe seja muito boa de trabalhar e torna

os resultados mais fáceis de serem alcançados.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e gentileza em participar da finalização deste trabalho com suas contribuições.

Aos colegas do LGHM, pela agradável convivência no laboratório e fora dele, pelo apoio técnico e moral. Em especial a Jéssica Fernandes pela ajuda na formatação dos trabalhos, nas reações de MLPA e pela grande amizade que extrapolou os muros da universidade.

Aos meus pais, Rita Ribeiro e Djalma Mota, pela vida, amor e ensinamentos. E que sempre acreditaram que a educação é o melhor presente que se pode dar a um filho.

Ao meu, mais que marido, companheiro de uma vida, Fábio Lima, cujo apoio me fortaleceu e com seu amor me tornou completa e estruturada. Obrigada, pelo incentivo, apoio e por entender os meus objetivos. Você foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Aos amigos pelo carinho, apoio e compreensão em vários momentos de ausência. Em especial a Pedro Paulo Carneiro, mais que um amigo, um irmão que a faculdade me deu, para todos os momentos.

Obrigada a todos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Seria muito mais difícil concretizar esse momento, sem a presença de todos vocês.

Meu muito obrigado!

À FAPESB pelo apoio a esta pesquisa.

MOTA, Laís Ribeiro. Perfil genético e caracterização fenotípica da fibrose cística em uma população miscigenada. 162 fl.; il. 2019. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

Introdução: A Fibrose Cística (FC) é a doença genética potencialmente letal, mais comum em caucasóides, sendo decorrente de uma alteração na função ou ausência de um polipeptídeo (CFTR, regulador da condutância transmembranar da fibrose cística), codificada pelo gene *CFTR*. O avanço das técnicas de biologia molecular tem permitido o melhor entendimento dessa patologia, a qual já possui mais 2000 variantes descritas no gene *CFTR*. A Bahia é um estado com população altamente miscigenada, o que deve conferir uma grande diversidade na frequência alélica destas variantes na população, com conseqüente variação na apresentação clínica da doença. Além disto, existe uma escassez de estudos acerca da FC no estado.

Objetivo: Determinar o perfil genotípico e caracterizar fenotipicamente uma população pediátrica com FC assistida no Ambulatório Multidisciplinar da Fibrose Cística do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (AMFC), entre 2005 e 2019. **Métodos:** O grupo amostral foi composto por 57 pacientes clinicamente e laboratorialmente diagnosticados com FC, com idade entre 0 e 20 anos. Foram realizadas coletas de sangue periférico e swab bucal para estudos genéticos e coletados dados clínicos através de prontuários médicos. **Resultados:** até o momento, este estudo originou cinco artigos já publicados que estão apresentados em capítulos. O capítulo 1 traz a apresentação clínica de pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para a mutação. No capítulo 2, foi realizada uma revisão acerca da importância do estudo genético na FC, com ênfase na aplicação da medicina personalizada. No capítulo 3, foi realizado o relato de uma série de casos de pacientes com FC que apresentaram mutações de ocorrência rara ou ainda não descritas no Brasil. No capítulo 4, foi apresentado um relato de caso de uma apresentação clínica rara da FC. E no capítulo 5, foram apresentados os genótipos de 50 pacientes com FC, onde foram encontradas 19 diferentes mutações, entre estas uma não previamente descrita na FC. Além destes, mais dois artigos estão em andamento. **Considerações finais:** Este é o primeiro estudo que descreve perfil mutacional e características fenotípicas de paciente com FC na Bahia e servirá como

base para trabalhos de caracterização clínico-epidemiológica e genética da FC no estado. Estes estudos são de fundamental importância, pois, espera-se que cada região do Brasil apresente um perfil genético diferenciado, devido à diversidade da população em cada uma delas. Este estudo deve contribuir para planejamentos de programas de saúde pública direcionados à implantação do diagnóstico molecular da doença, bem como na racionalização da assistência aos pacientes com FC.

Palavras chave: Fibrose Cística, Genética, Genótipo, Fenótipo, Regulador de Condutância Transmembrânica em Fibrose Cística.

MOTA, Laís Ribeiro. Perfil genético e caracterização fenotípica da fibrose cística em população miscigenada. 162 fl.; il.2019. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

ABSTRACT

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is a potentially lethal genetic disease, most common in Caucasians, resulting from a change in the function or absence of a polypeptide (CFTR), a regulator of the transmembrane conductance of cystic fibrosis encoded by the *CFTR* gene. The headway of molecular biology techniques has provided a better understanding of this pathology, which already has over 2000 mutations described in the *CFTR* gene. Bahia is a state in Brazil with a mixed-race population, which contributes to a great diversity in the allelic frequency of these mutations in the population with consequent variation in the clinical presentation of the disease. In addition, there is sort of a lack of studies on CF in that state.

Objective: To determine the genotypic profile and characterize phenotypically a pediatric population diagnosed with CF assisted at the Professor Edgard Santos Hospital Complex's Multidisciplinary Cystic Fibrosis Outpatient Clinic (AMFC), between 2005 and 2019. **Methods:** The sample group consisted of 57 patients clinically diagnosed with CF aged between 0 to 20 years. **Results:** To this date, this study has turned into five already published articles and which are presented in the chapters of this work. The chapter 1, presents the clinical presentation of compound homozygous or heterozygous patients for the F508del mutation. In chapter 2, a review on the importance of genetic study in CF, with emphasis on the application of personalized medicine, was performed. In chapter 3, a case report of a CF rare manifestation was presented. In the fourth chapter, it was reported a series of cases of patients with rare or undescribed mutations of CF in Brazil. And chapter 5 the genotypes of 50 patients were presented in which 19 different mutations, one not yet described in the literature were found. In addition to the above-mentioned articles, two more are underway. **Final considerations:** This is the first study that describes the mutational profile and phenotypic characteristics of CF patients in Bahia and will serve as a basis for clinical, epidemiological and genetic characterization of CF in the state. These studies are fundamentally important, as it is expected that each region of Brazil presents a different genetic profile due to the diversity of the population in

each one of them. This study might contribute to the planning of public health programs directed to the implementation of the molecular diagnosis of the disease, as well as the rationalization of care for CF patients.

Keywords: Cystic Fibrosis, Genetics, Genotype, Phenotype, Transmembrane Conductance Regulator Cystic Fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito das terapias na expectativa de vida de pacientes com FC.	6
Figura 2- Canais de cloro normal e anormal.....	10
Figura 3- Mecanismo fisiopatológico dos distúrbios pulmonares na fibrose cística..	12
Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento das glândulas sudorípara normal e com alteração na proteína CFTR.	15
Figura 5- Esquema do gene <i>CFTR</i>	18
Figura 6- Proteína CFTR.....	19
Figura 7 - Classes funcionais das mutações <i>CFTR</i>	21
Figura 8- Contribuições genéticas e ambientais nos fenótipos clínicos em pacientes	29
Figura 9- Representação esquemática do padrão de herança da FC.....	40

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos.	8
Quadro 2- Heterogeneidade alélica no gene <i>CFTR</i> na população brasileira	23
Tabela 1- Alguns estudos sobre genes modificadores.....	30
Quadro 3- Indicação de uso para medicações moduladoras para FC.....	38

CAPITULO I

Tabela 1- Genótipo e variáveis clínicas dos 22 pacientes com a mutação F508del acompanhados pelo AMFC em Salvador, 2012 a 2016.....	55
Tabela 2- Principais sintomas apresentados pelos pacientes com a mutação F508del que levaram ao diagnóstico da Fibrose Cística no AMFC em Salvador.....	56

CAPITULO III

Tabela 1- Descrição do genótipo e fenótipo de dez pacientes com FC com mutações raras ou ainda não descritas entre pacientes brasileiros.	77
---	----

- Figura 1-** Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada A107P localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies.. 55
- Figura 2-** Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada K162E localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies...60
- Figura 3-** Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada E1409K localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies...60

CAPITULO IV

- Figura 1** - Paciente com cinco meses apresentando edema generalizado, pápulas eritematosas com descamação difusa e sibilante.89
- Figura 2-** Menino com cinco meses apresentando edema generalizado, sibilos e pápulas eritematosas com descamação envolvendo face, costas e membros.89
- Figura 3-** Recuperação do paciente após algumas semanas de tratamento, mostrando regressão inicial do edema e das lesões na pele.....90
- Figura 4-** Paciente após alguns anos de tratamento da fibrose cística com crescimento e estado nutricional adequados90

CAPITULO V

- Tabela 1-** Genótipos de pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.....97
- Tabela 2** - Frequência das mutações encontradas em pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.....98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FC (Fibrose Cística)
Proteína CFTR (Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística)
Gene *CFTR* (Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística)
SUS (Sistema Único de Saúde)
SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo único)
DPN (Diferença de Potencial Nasal)
DNA (Ácido desoxirribonucleico)
RNA (Ácido ribonucléico)
mRNA(Ácido ribonucléico mensageiro)
AMPc(Adenosina monofosfato cíclico)
ATP (Adenosina trifosfato)
NaCl⁻ (Cloro de Sódio)
Cl⁻ (Cloro)
Na⁺ (Sódio)
K⁺ (Potássio)
MgCl₂(Cloro de magnésio)
dNTP's (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
AG (Aconselhamento genético)
TIR (Tripsina Imunorreativa)
PCR (Reação em cadeia da Polimerase)
RFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição)
IP (Insuficiência pancreática)
SP (Suficiência pancreática)
IM (Íleo meconial)
CBAVD (Agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes)
CFF(Cystic Fibrosis Foundation)
REBRAFC (Registro Brasileiro de Fibrose Cística)
VEF₁ (volume expiratório forçado)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 HISTÓRICO DA FC	5
2.3 ASPECTOS CLÍNICOS	9
2.4 GENÉTICA	17
2.5 DIAGNÓSTICO	31
2.6 TRATAMENTO	35
2.7 ACONSELHAMENTO GENÉTICO	39
3 OBJETIVO	43
3.1 OBJETIVO GERAL	44
4 MÉTODOS	45
4.1 TIPO DE ESTUDO	46
4.2 PACIENTES	46
4.3 VARIÁVEIS	46
CAPÍTULO I	48
CAPÍTULO II	64
CAPÍTULO III	71
CAPÍTULO IV	86
CAPÍTULO V	94
5 SUPLEMENTO	101
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	105
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICE	124
ANEXOS	154

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é a doença monogênica autossômica recessiva mais comum em caucasianos, sendo uma importante causa de morte nessa população. Decorre de mutações em um gene localizado no cromossomo 7, que codifica a proteína transmembrana de mesmo nome: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR). Desde a identificação do gene CFTR, mais de 2 mil mutações foram descritas (FARREL *et al.*, 2008; CFTR1, 2019).

A proteína CFTR é um canal iônico, onde o defeito pela limitada secreção de cloro (Cl⁻) e a maior reabsorção de sódio (Na⁺) e água trazem como consequência alterações na viscosidade do muco, desidratando-o e tornando-o mais espesso e viscoso. Podendo obstruir ductos de vários órgãos, resultando assim em manifestações multissistêmicas, como nos sistemas respiratório, digestivo e hepático, nas glândulas sudoríparas, no aparelho reprodutor masculino e feminino (WELSH *et al.*, 2001).

No Brasil, a FC é possivelmente subdiagnosticada e a incidência fidedigna da doença ainda não é conhecida, tendo em vista a limitação da triagem neonatal no país e a baixa suspeição clínica pelos profissionais médicos (FAUCZ *et al.*, 2010). Entretanto, tendo como base estudos realizados em alguns estados, estima-se que a incidência seja em torno de 1/7.358. Segundo o Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), em 2017, mais de 4.700 mil indivíduos são acompanhados em centros de referência para doença.

Uma das formas de diagnóstico é a identificação de duas mutações patológicas no gene. Porém, o diagnóstico molecular da FC apresenta dificuldades devido ao grande número de mutações já descritas e ao elevado custo das técnicas no país. No Brasil, o estudo de todas as mutações no gene CFTR não é uma realidade por alguns motivos: i) não é custeado pelo SUS; ii) coexiste uma grande diversidade étnico-racial entre as cinco regiões político-geográficas e os painéis comerciais de mutações (que possuem um custo reduzido) são específicos para populações euro-descendentes.

Vários estudos foram realizados em diferentes estados do Brasil e todos demonstram uma heterogeneidade alélica da população em relação a populações

de predominância europeia e a necessidade da realização de pesquisas regionais para determinar o perfil mutacional de cada região específica. Nesta perspectiva, busca-se estabelecer o perfil mutacional, bem como caracterizar fenotipicamente pacientes com FC no Estado da Bahia. Para que estudos mais direcionados sejam realizados a fim de auxiliar no diagnóstico mais rápido e específico e, assim, no tratamento mais eficiente, o que é de extrema importância considerando a grande variedade clínica da doença podendo muitas vezes melhorar o prognóstico do paciente. O diagnóstico específico também é importante para aplicação da medicina de precisão e para o aconselhamento genético às famílias, antes de uma possível nova gestação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA FC

Antes de ser caracterizada como uma entidade patológica, a FC era mencionada pelo folclore norte europeu que dizia "amaldiçoada a criança que quando beijada na testa tivesse o gosto salgado, pois era enfeitiçada e morreria cedo" (WELSH *et al.*, 2001).

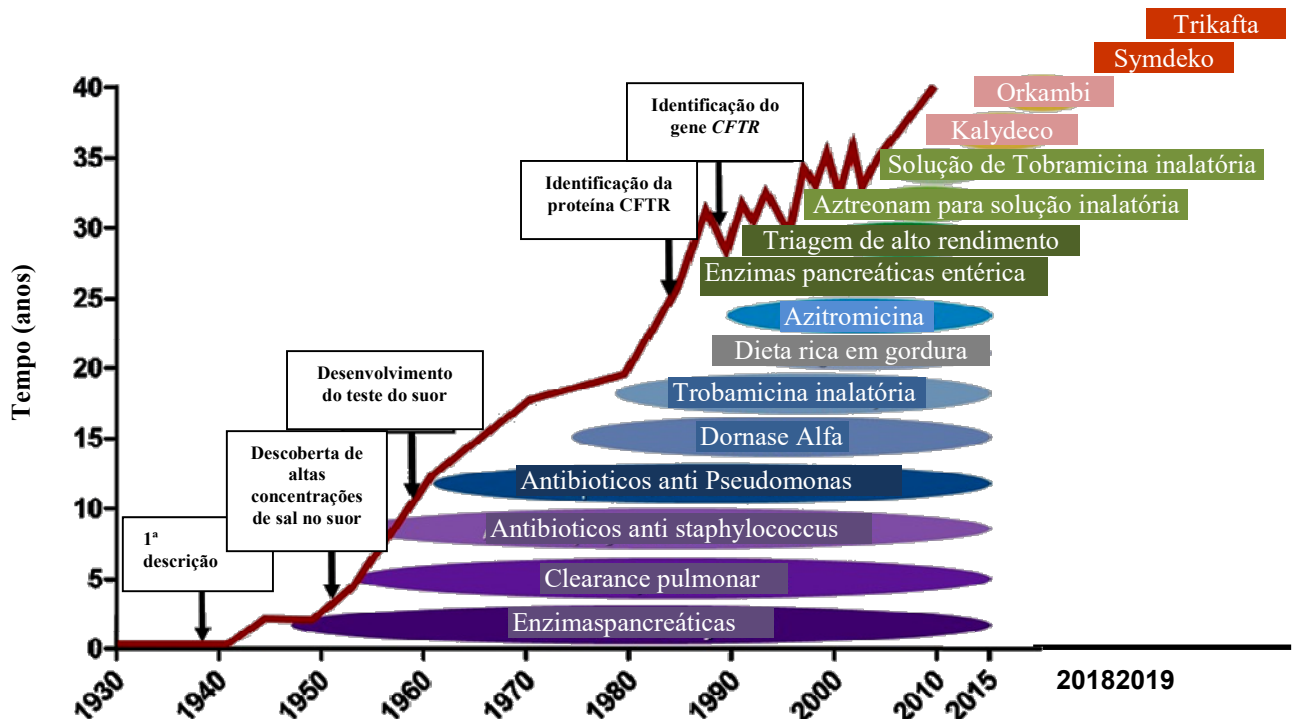
A FC foi reconhecida, nos últimos 70 anos, como uma doença genética, comum em populações caucasianas, sendo a mais letal dentre as autossômicas recessivas. Sua primeira descrição foi em 1938, pela patologista Dorothy Andersen, onde relatou uma desordem anatomopatológica diferente da doença celíaca, denominando-a doença fibrocística do pâncreas.

Em 1945, Farber e Shwachman criaram o termo mucoviscidose, propondo a hipótese de que os sistemas de ductos e outros transportes em órgãos afetados pela FC eram obstruídos por secreções espessas e viscosas, responsáveis pelos quadros pulmonares e pancreáticos. Posteriormente, em 1949, Lowe, May e Reed descreveram minuciosamente o padrão de herança autossômico recessivo da doença.

Em 1951, observou-se o elevado teor de cloro de sódio no suor de pacientes com FC (DI SANT'AGNESE *et al.*, 1953). Esses achados foram fundamentais para que Gibson e Cook (1959) desenvolvessem, posteriormente, uma técnica de diagnóstico por meio da dosagem de cloro no suor, considerado até hoje o teste padrão ouro para doença.

Durante a década de 1950, surgiram centros especializados no tratamento da FC, que possibilitaram modelos terapêuticos e grandes avanços no tratamento (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2019). Na mesma década, houve o surgimento dos primeiros medicamentos para o tratamento da doença (Figura 1). Em 1954, Stoppelman e Shwachman descreveram um método eficiente de tratamento, que combinava: diagnóstico precoce da doença, suporte nutricional e tratamento precoce das infecções com antibioticoterapia.

Figura 1 – Efeito das terapias na expectativa de vida de pacientes com FC.



Fonte: Adaptado de Lopes-Pacheco (2016).

Legenda: Ilustração esquemática de como a descoberta e introdução de novos tratamentos da FC influenciaram a sobrevivência dos pacientes ao longo das décadas.

Em 1979, Crossley, Elliott e Smith demonstraram o aumento da tripsina imunorreativa (TIR) no sangue, em recém-nascidos com FC. Admitiu-se, então, que o aumento da tripsina seja secundário ao refluxo de secreção pancreática, provocado pela obstrução dos ductos pancreáticos. Em 1983, Paul Quinton e sua equipe começaram a desvendar o defeito básico da secreção do íon de cloro, demonstrando que a impermeabilidade ao cloro estava presente nas glândulas de suor.

Em 1989, numa colaboração internacional, foi identificado um gene de 250 Kb, responsável pela FC, denominado *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR). (KEREM *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989). À época, houve muitas tentativas mal sucedidas de correlação entre o genótipo e o fenótipo, onde naquele momento só foi possível perceber que existia alguma

correlação das mutações leves com a preservação da função pancreática e melhora na condição clínica.

Atualmente, a maioria das abordagens para o tratamento baseia-se no consenso criado pela organização *Cystic Fibrosis Foundation*, cujo objetivo é melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes. O tratamento de excelência é multidisciplinar e oferecido por centros de referência em todo o mundo. Os pacientes utilizam medicamentos, que vão desde a profilaxia ao tratamento, como antibióticos, reposição de sal, mucolíticos, reposição enzimática e, mais recentemente, os moduladores CFTR, os quais atuam de acordo com o defeito produzido pela mutação na proteína, podendo ser corretores ou potencializadores. Além disto, são acompanhados frequentemente por médicos, nutricionistas, fisioterapeutas e psicólogos, adaptados para cada fase da vida, respeitando as alterações ao longo do crescimento (RIBEIRO *et al.*, 2002; VERTEX PHARMACEUTICALS, 2019).

2.2 A FIBROSE CÍSTICA

Fibrose cística (OMIM 219700), ou mucoviscidose, é definida como uma doença multissistêmica, de herança monogênica autossômica recessiva letal mais comum na população caucasiana, tornando-se uma importante causa de morte naquela população (FARREL *et al.*, 2008). Ela afeta todos grupos raciais, mas principalmente os caucasoides, sendo menos frequente em negros e rara em asiáticos, atingindo igualmente homens e mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Estima-se que haja atualmente 85 mil casos em todo o mundo (DE BOECK; AMARAL, 2016). Sua incidência é bem documentada na Europa: em média 1:2.000-3.000 recém-nascidos. Entretanto, essa incidência pode variar entre diferentes países ou regiões (Quadro 1), por exemplo, 1:4.000-1:10.000 em latino-americanos (O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009), sendo menos frequente em negros (1:7056 na África do Sul) e rara em asiáticos - 1:350.000 no Japão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Quadro 1- Incidência de FC nos diversos grupos étnicos

População/Origem	Incidência
Europeus	1:2.500
Povos hispânicos	1:9.500
Índio norte-americano	1:10.000
Negros americanos	1:15.000
Africanos	1:40.000
Asiáticos	1:50.000
Latino-americanos *	1:4.000/10.000
Brasil *	1:7.358

Fonte: Fitzsimmons (1993), Raskin e colaboradores (2008) e O'Sullivan e Freedman (2009).
 Legenda: *Dados obtidos através de estudos de algumas regiões, pois não existem estudos epidemiológicos ou triagem neonatal suficientemente abrangentes que permitam estimar a incidência nas diversas regiões do país.

A FC é causada por mutações no gene *CFTR* (KEREM *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989), localizado no braço longo do cromossomo 7 (*locus 7q31*), levando à ausência ou à perda da função da proteína CFTR, que, em condições normais, atua como um canal de cloro (MISHRA *et al.*, 2005).

No Brasil, não existe nenhum estudo epidemiológico ou de triagem neonatal que defina a incidência da doença no país como um todo, pois os trabalhos realizados sobre a doença são restritos principalmente às regiões Sul e Sudeste e não refletem a realidade do país, o que confere uma falsa impressão de baixa incidência. Entretanto, estudos já foram realizados em diferentes Estados, onde a estimativa da incidência no Estado do Rio Grande do Sul é de 1:2.000 nascidos vivos (LEMOS *et al.*, 2004); em São Paulo, 1:32.258; em Santa Catarina, 1:12.195; no Paraná, 1:6.803; em Minas Gerais, 1:21.277 (RASKIN, 2008); no Rio de Janeiro, 1:6.902 (CABELLO *et al.*, 1999). A variação encontrada foi atribuída ao grau de miscigenação das diferentes regiões estudadas, contudo, esses estudos regionais sugerem uma incidência em torno de 1:7.358 no país como um todo (RASKIN *et al.*, 2008). Segundo o relatório do REBRAFC de 2016, mais de 4.700 mil indivíduos são acompanhados em centros de referência para doença.

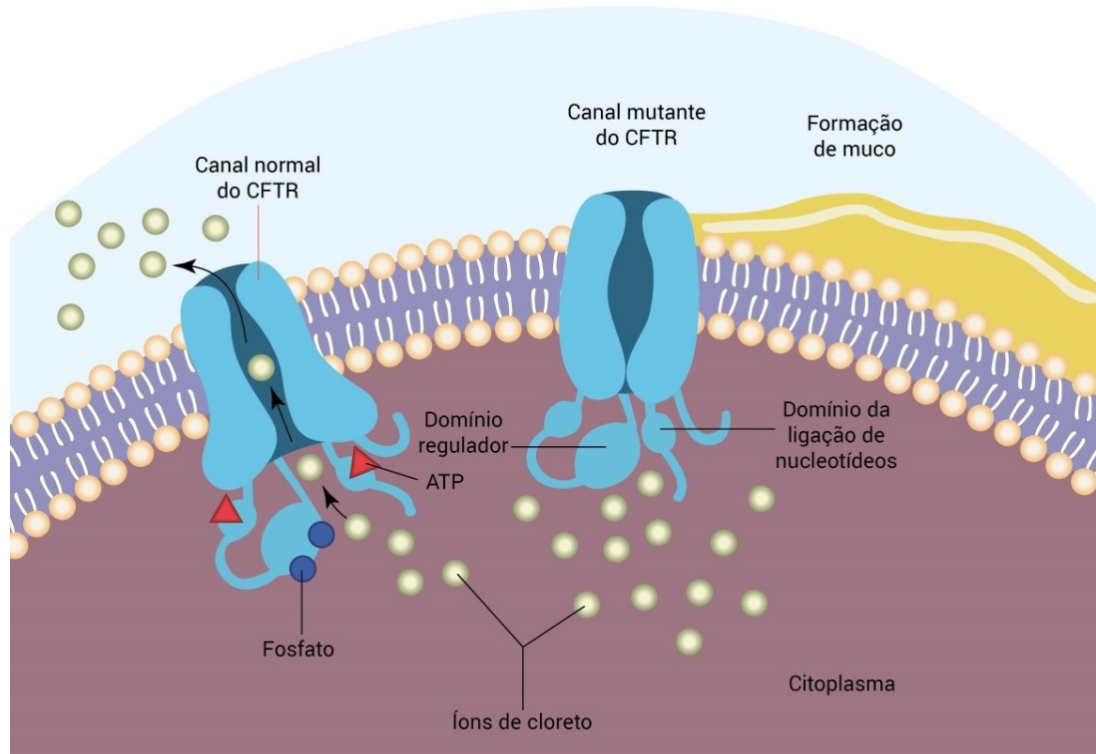
Após a implantação da triagem neonatal em alguns estados, trabalhos publicados apresentam as seguintes incidências: Paraná, 1:9.520, Santa Catarina, 1:8.779, Minas Gerais, 1:9.115 e São Paulo, 1:8.403 (SANTOS *et al.*, 2005;

HONÓRIO *et al.*, 2006; REIS; MELO; VERGARA, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009). Nos estados em que a implantação da triagem neonatal é mais recente, ainda não há dados disponíveis.

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A FC apresenta um quadro clínico altamente variado e os pacientes podem ser diagnosticados desde a gestação até a fase adulta, com considerável diversidade quanto à gravidade e à taxa de progressão da doença (MISHRA *et al.*, 2005). As consequências da perda de função da proteína CFTR variam de acordo com os órgãos envolvidos. A secreção inadequada de Cl^- e a excessiva reabsorção de Na^+ , disfunção característica da FC, causam desidratação do muco das glândulas exócrinas de vários órgãos, incluindo: vias aéreas, ductos pancreáticos, vasos deferentes, sistema hepatobiliar e glândulas sudoríparas (Figura 2); também provoca elevação da concentração de NaCl no suor, levando a uma característica muito comum de suor salgado nesses pacientes. Consequentemente, resulta numa doença multissistêmica, caracterizada por obstrução das vias respiratórias, insuficiência pancreática (IP), cirrose biliar multifocal, problemas de motilidade intestinal, má nutrição, infertilidade masculina e perda de eletrólitos no suor (WELSH *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2005).

Figura 2 - Canais de cloro normal e anormal



Fonte: Stephen (2015).

Legenda: O funcionamento normal da CFTR transporta os íons de cloro para o exterior da célula. Enquanto no canal CFTR mutante isso não corre, formando um muco espesso no exterior da célula.

Os sinais e sintomas da FC podem ocorrer desde o nascimento, como o íleo meconial (IM), ou nas primeiras semanas de vida, como tosse, cristais de sal sobre a testa e suor muito salgado; ou mais tardiamente, podendo apresentar-se apenas na fase adulta. As manifestações pulmonares, gastrintestinais, atraso de crescimento e do desenvolvimento, ou formas menos frequentes, como hipoproteinemia e depleção de sal, associadas a teste de cloro no suor positivo (≥ 60 mEq/L) são apresentações clássicas da doença (DE BOECK *et al.*, 2006; VALENTIM, 2008). Entretanto, aproximadamente 10% dos pacientes com FC têm manifestações clínicas presentes em somente um dos órgãos ou sistemas (pâncreas, trato respiratório, trato reprodutivo masculino ou glândulas sudoríparas). Esse fenômeno incompleto, associado a valores duvidosos de teste de cloro no suor (30 a 59 mEq/L), tem sido chamado de CFTR-RD (CFTR-Related Disorders) (POLIZZI *et al.*, 2011). Pacientes

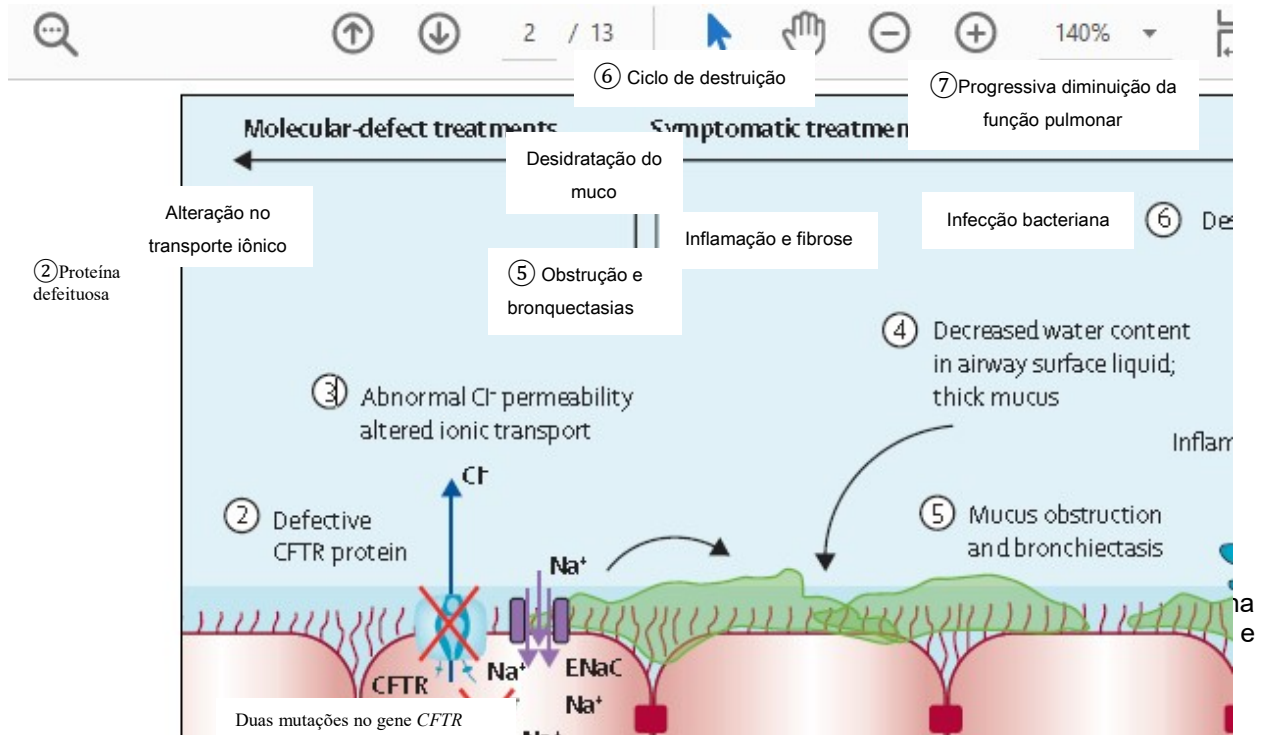
com essa forma da doença apresentam melhor estado nutricional, sobrevivência mais longa, início tardio ou lenta progressão da doença pulmonar, função anormal das glândulas sudoríparas, porém não na mesma extensão dos pacientes com FC clássica (KNOWLES; DURIE, 2002). Essa grande variabilidade fenotípica da doença faz com que os sintomas sejam muitas vezes atribuídos a outras doenças ou a casos isolados, como pneumonia e bronquite.

2.3.1 MANIFESTAÇÕES PULMONARES

Embora a FC seja uma doença multissistêmica, as complicações pulmonares são a principal causa de morbimortalidade (mais de 90% dos pacientes morrem devido a esta causa). A doença pulmonar se apresenta de forma progressiva e com intensidade variável (ALVAREZ, 2002; MISHRA *et al.*, 2005). A intensidade de acometimento é que determina o prognóstico da doença. Ao nascimento, as crianças com FC apresentam pulmões estrutural e histologicamente normais e as alterações se iniciam nas pequenas vias aéreas. A lesão inicial é a dilatação e hipertrofia das glândulas secretoras, mas com o tempo, infecções e inflamações sucessivas, culminam em bronquiectasia, hipertensão pulmonar e insuficiência respiratória crônica, podendo ocorrer pneumonias de repetição (HODSON, 2000).

Devido à ineficiência na eliminação do muco, os pulmões ficam altamente suscetíveis à infecção bacteriana. Os microrganismos mais comumente encontrados são *Pseudomonas aeruginosa* (61%), *Staphylococcus aureus* (28,3%), *Haemophilus influenzae* (8,9%) e *Burkholderia cepacea* (3,2%) (ROBINSON, 2001). A fisiopatologia das infecções, sobretudo bacterianas, está relacionada à viscosidade aumentada do muco, associada à assimetria do movimento ciliar, que provoca acúmulo de muco nas vias aéreas respiratórias, começando pelos bronquíolos, em direção aos brônquios de maior calibre. Como consequência, o parênquima pulmonar fica comprometido, favorecendo a proliferação bacteriana no trato respiratório (ROBINSON, 2001; ROGERS *et al.*, 2010). O mecanismo fisiopatológico dos distúrbios pulmonares está representado na Figura 3.

Figura 3 – Mecanismo fisiopatológico dos distúrbios pulmonares na FC.



A tosse crônica persistente é a manifestação respiratória mais comum, podendo ocorrer desde as primeiras semanas de vida, perturbando o sono e a alimentação do lactente. Muitas crianças com FC apresentam história de bronquiolite, síndrome do lactente chiador, infecções respiratórias recorrentes ou pneumonias de repetição. Alguns pacientes são oligossintomáticos por vários anos, mas isto não impede a progressão silenciosa para bronquiectasias. A doença pulmonar evolui em praticamente 100% dos pacientes para *cor pulmonale*. Nas fases avançadas da doença, os pacientes apresentam tórax enfisematoso, broncorreia purulenta, frequência respiratória aumentada, dificuldade expiratória, cianose periungueal e baqueteamento digital acentuado. Frequentemente, queixam-se de falta de ar durante exercícios e fisioterapia e, posteriormente, em repouso (RIBEIRO *et al.*, 2002).

As complicações pulmonares incluem hemoptises recorrentes, impactações mucoides brônquicas, atelectasias, empiema, enfisema progressivo, pneumotórax, fibrose pulmonar, osteopatia hipertrófica e *cor pulmonale*. A polipose nasal recorrente pode ser a primeira manifestação da doença e ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes (RIBEIRO *et al.*, 2002).

2.3.2 MANIFESTAÇÕES GASTROINTESTINAIS

As manifestações clínicas relacionadas ao aparelho digestivo são variáveis. Dentre elas, a mais importante e frequente é a insuficiência exócrina do pâncreas que, segundo Maclushy (1990), ocorre ainda no período intrauterino, quando há uma inflamação, com perda de função e fibrose do órgão. Essa insuficiência acomete cerca de 80 a 90% dos pacientes, que apresentam grau variável e comprometimento progressivo, com desenvolvimento gradual de fibrose do órgão, devido à obstrução dos ductos pela presença de muco (SALVATORE *et al.*, 2002).

A deficiência de enzimas pancreáticas causa má absorção de gorduras, sendo caracterizada por diarreia crônica e esteatorreia. A desnutrição pode se instalar rapidamente pela perda de calorias, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e proteínas, devido à má digestão alimentar, além do aumento das necessidades calóricas, causado pelas repetidas infecções respiratórias. Devido a está má absorção, há necessidade da administração de suplementos enzimáticos juntamente com o alimento e a manutenção da ingestão de dieta altamente calórica, que favorece a absorção dos nutrientes (REIS; DAMACENO, 1998; WELSH *et al.*, 2001).

Os pacientes podem também cursar com apetite voraz, síndrome de má absorção, prolapso retal, refluxo gastresofágico, edema hipoproteinêmico secundário à IP. Outra manifestação importante é o (IM), que ocorre quando o recém-nascido tem dificuldade de eliminar o mecônio, bloqueando o intestino (DAVIS, 2006). O IM acomete cerca de 10% a 20% dos recém-nascidos com FC e os sinais da obstrução intestinal podem aparecer dentro das primeiras 48 horas do nascimento (MUNCK *et al.*, 2006). A presença do IM é indicativa de FC e facilitador do diagnóstico precoce, mas um fator não associado à gravidade clínica do paciente e sua expectativa de vida (EFRATI *et al.*, 2010).

O comprometimento hepatobiliar é relatado desde a primeira descrição da FC e está presente em mais de 50% das necropsias. A secreção anormal de íons pelo epitélio das vias biliares leva à hiperviscosidade, com redução do fluxo biliar, predispondo à obstrução biliar e à inflamação (FRIEDMAN, 1993). Habitualmente, as manifestações hepatobiliares na FC se iniciam no fim da primeira década de vida,

com prevalência de 5,7% a 39%, sendo a terceira causa de mortalidade nos pacientes com FC. Entretanto, isto pode variar a depender a população analisada. Em estudo, Nascimento e colaboradores (2018) encontraram a doença hepatobiliar como manifestação inicial da FC em 55,6% dos casos estudados naquela população. A cirrose biliar focal está presente em 70% das autópsias de pacientes mais velhos e 2-5% deles têm cirrose multilobular (SOKOL; DURIE, 1999). A doença associada ao fígado tem piora lenta quando comparada à doença pulmonar (HERRMANN, 2010); além disso, é considerada um fator preditor de risco na evolução e no prognóstico desfavorável da FC (COLOMBO *et al.*, 1994).

2.3.3 MANIFESTAÇÕES NO SISTEMA REPRODUTOR

Sobre o sistema reprodutor, destaca-se que 98% dos homens com FC são inférteis. A base anatômica é a agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD) ou uma atrofia, fibrose/ausência do epidídimo, dos vasos deferentes, vesícula seminal e ductos ejaculatórios (QUINZII; CASTELLANI, 2000; O'SULLIVAN; FREEDMAN, 2009). Em 98% dos homens com FC, ocorre a azoospermia por obstrução do trato reprodutivo devido ao muco espesso, ainda no período intrauterino (CORREIA, 2005).

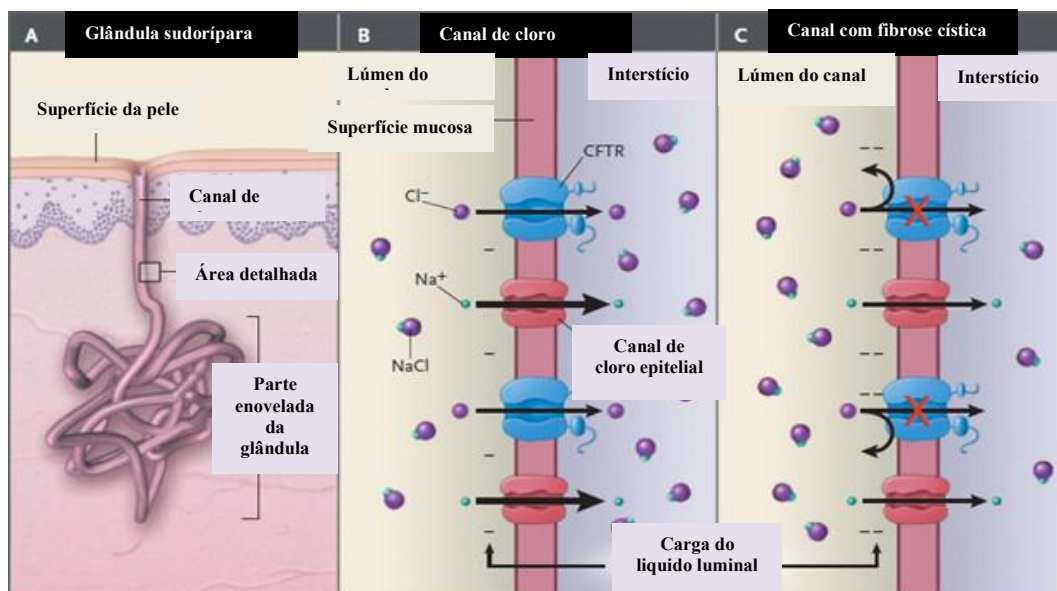
A espermatogênese não é comprometida na maioria dos casos, contudo, a progressão dos espermatozoides até a uretra é afetada pelas alterações obstrutivas, sendo recomendada, nesses casos, a reprodução assistida (HUBERT *et al.*, 2006).

Com relação às mulheres, é comum a ocorrência de menarca tardia, sendo que 60% das pacientes têm fertilidade reduzida devido à viscosidade do muco cervical que, além de anormal, tem características bioquímicas alteradas, agindo como um espermicida (GILLJAM *et al.*, 2000).

2.3.4 GLÂNDULAS SUDORÍPARAS

As glândulas sudoríparas não apresentam nenhuma anormalidade estrutural ou histológica e a taxa de transpiração também é normal, embora variável. Nessas glândulas, a CFTR funciona reabsorvendo o Cl^- do lúmen. Quando a proteína está defeituosa ou ausente, o Cl^- deixa de ser reabsorvido, ficando em concentrações elevadas no lúmen. O Na^+ , por sua vez, é hipersecretado, fazendo com que o Cl^- e o Na^+ sejam encontrados em concentrações elevadas no suor. Essas características são utilizadas como método diagnóstico, no teste do suor (EMERY; RIMOIN'S, 2002; MISHRA *et al.*, 2005). A representação esquemática consta na Figura 4. Outra consequência é a excessiva perda de sais pelas glândulas sudoríparas; pacientes que apresentam essa manifestação clínica podem ter *deficit* importante de sais e alcalose metabólica crônica (WELSH *et al.*, 2001; EMERY; RIMOIN'S, 2002).

Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento das glândulas sudorípara normal e com alteração na proteína CFTR.



Fonte: Adaptado de Rowe, Millere Sorscher (2005).

Legenda: a) Nas glândulas sudoríparas normais, a CFTR funciona reabsorvendo o cloro do lúmen. b) Quando a proteína está defeituosa o cloro deixa de ser reabsorvido, ficando em concentrações elevadas no lúmen. O sódio, por sua vez, é hipersecretado, fazendo com que o cloro e o sódio sejam encontrados em concentrações elevadas no suor.

2.3.5 MANIFESTAÇÕES SECUNDÁRIAS

Diabetes

O tecido endócrino pancreático é inicialmente preservado. Entretanto, com a evolução da doença, as células e o tecido glandular são perdidos por já estarem totalmente substituídos por fibrose e gordura (ACCURSO, 2006). A intolerância à glicose pode ocorrer e a diabetes *mellitus* afeta 2% dos pacientes menores de 10 anos e até 50% dos pacientes com idade superior a 30 anos. A utilização de suplementos e de corticosteroides é visto como um fator de risco para o desenvolvimento da diabetes *mellitus* na FC e a diabetes está associada com a piora clínica do paciente (ALEXANDER; BRIDGES, 2010).

Osteoporose

A osteoporose é uma importante complicação no quadro clínico dos pacientes com FC; eles desenvolvem a doença óssea por deficiência de absorção da 25-hidroxi-vitamina D (ACCURSO, 2006). Geralmente, pacientes com doença avançada apresentam osteoporose com cifose, colapso vertebral e aumento da frequência de fraturas ósseas (DÖRING; CONWAY, 2008). A redução de densidade óssea (tanto osteopenia quanto osteoporose) está presente em cerca de 40 a 70%, dos adultos com FC, principalmente entre aqueles submetidos a transplante de pulmão. O acompanhamento nutricional, a reposição de cálcio e de vitamina D, a monitorização regular da absorção intestinal e dos níveis plasmáticos de vitamina D, devem reduzir a incidência e a gravidade da osteoporose, sendo este um fator crucial para o melhor prognóstico do paciente (JAVIER; JACQUOT, 2011).

Desnutrição

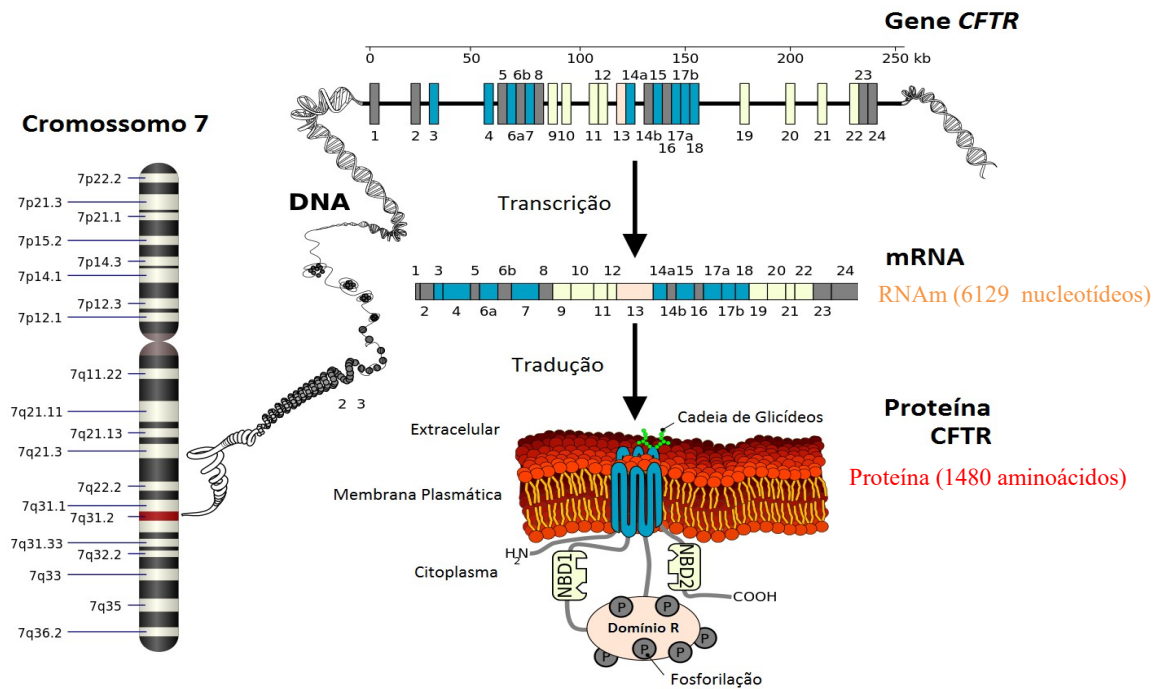
A desnutrição é considerada um dos principais fatores de mau prognóstico, podendo se manifestar através da redução do crescimento, emagrecimento acentuado, deficiências nutricionais, atraso no desenvolvimento e grave comprometimento da função pulmonar. A intervenção nutricional na FC é fundamental para o tratamento: na melhora do crescimento, estabilização da função pulmonar, reposição de vitaminas e nutrientes essenciais e no balanceamento da dieta de acordo a necessidade do paciente, ajustada à reposição enzimática (REIS *et al.*, 2000; FIATES *et al.*, 2001).

2.4 GENÉTICA

2.4.1 O GENE E A PROTEÍNA CFTR

O gene *CFTR* foi identificado em 1989 por Lap-Chee Tsui e colaboradores. Localizado no braço longo do cromossomo 7, no *locus* q31.2, é formado por 27 quilobases, com 27 éxons. Esse gene codifica um RNAm de 6,5 quilobases, que transcreve uma proteína transmembrana, reguladora de transporte iônico, composta por 1.480 aminoácidos, conhecida como *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (*CFTR* - Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística) (KEREM *et al.*, 1989; RIORDAN *et al.*, 1989; ROMMENS *et al.*, 1989), apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema do gene *CFTR*.



Fonte: Adaptado de Gallati (2013).

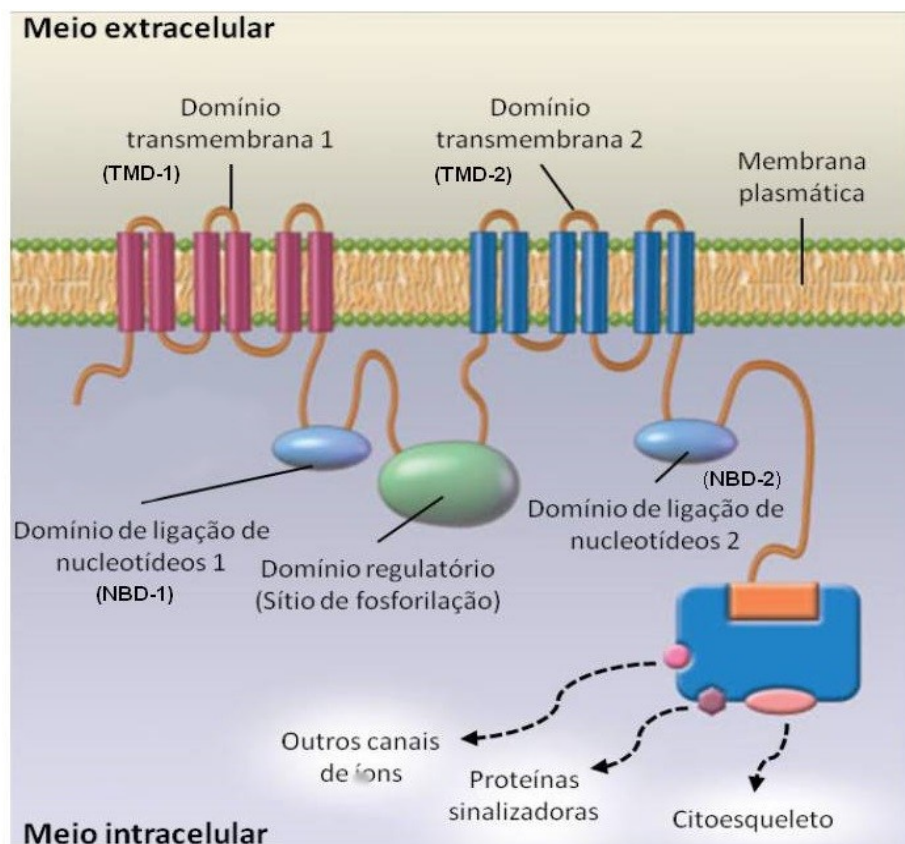
Após ser transcrito em RNAm, traduzido, modificado pós-traducionalmente, a proteína CFTR é transportada à membrana celular por meio do Complexo de Golgi. Esta glicoproteína, também chamada de canal de cloro, integra a família de transportadores de membrana acoplados a ATP (ABC – *ATP-binding cassette*), é sintetizada no núcleo, sofre maturação em organelas citoplasmáticas (fosforilação e glicosilação) e localiza-se na membrana apical das células. A CFTR é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de Cl^- , Na^+ e água, sendo regulada por AMPc (WELSH *et al.*, 2001; LI; NAREN, 2005).

A expressão do gene *CFTR* apresenta um padrão altamente regulado temporal e espacialmente, sendo transcrito em concentrações relativamente baixas nas células epiteliais do trato respiratório em adultos e em níveis altos nos pulmões de fetos. Os níveis mais altos de RNA são encontrados no pâncreas, nas glândulas salivares, nas glândulas sudoríparas, no intestino e no trato reprodutor (MCCARTHY; HARRIS, 2005; SARAIVA-PEREIRA *et al.*, 2011). Muitas células

epiteliais regulam a secreção de Cl^- através da modulação da atividade e do número de canais CFTR na membrana (GUGGINO; STANTON, 2006). Além de funcionar como um canal de cloro, a proteína CFTR também atua como um regulador de condutância, exercendo influências modulatórias sobre outros canais iônicos como: Na^+ e K^+ , transporte de proteínas, processos como mecanismos de liberação de ATP, regulação da secreção de bicarbonato, produção de óxido nítrico, entre outros (GUGGINO; STANTON, 2006).

A proteína CFTR é composta por dois domínios transmembrânicos (TMD-1 e TMD-2); dois domínios de ligação ao ATP (NBD-1 e NBD-2); e um único domínio regulatório (RD), com muitos sítios possíveis de fosforilação, que auxiliam na regulação da atividade do canal (RIORDAN; RIORDAN, 2005), representada esquematicamente na Figura 6.

Figura 6 -Proteína CFTR.



Fonte: Adaptado de Rowe, Millere Sorscher (2005).

2.4.2 MUTAÇÕES NO GENE *CFTR*

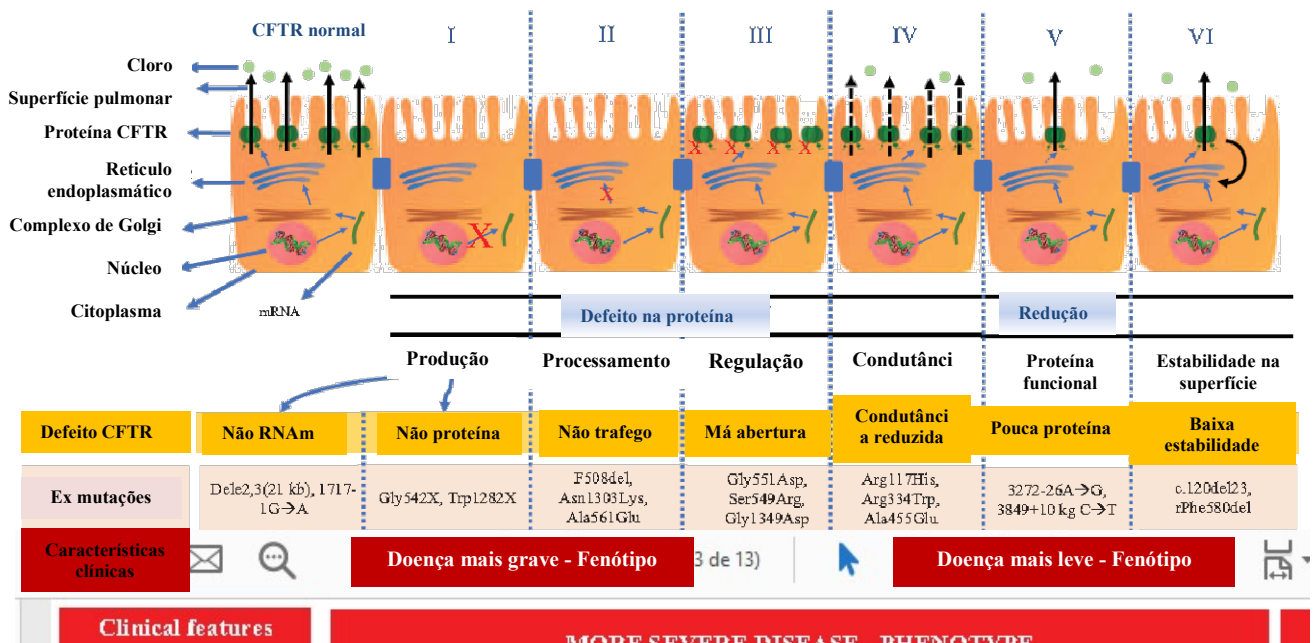
O gene *CFTR* é altamente susceptível a mutações devido ao seu tamanho. Até o momento, o Comitê Internacional de Análise Genética da FC já identificou 2.074 mutações. Destas, 346 são reconhecidas por causar FC; 37 são variantes de consequência clínica variável; oito são de significado desconhecido; e 21 são sabidamente não causadoras de FC (CFTR2, 2019).

Do total de mutações, 38,9% são *missense* (conduzem à substituição de um aminoácido), 16,1% são *frameshift* (pequenas deleções ou inserções que alteram a matriz de leitura durante a tradução, levando a uma proteína truncada), 11% são mutações que afetam o local de *splicing* (provocam defeitos no processamento do mRNA) e 8,4% são *nonsense* (originam códons de parada da transcrição do DNA). Das alterações restantes no gene *CFTR*, 12,9% correspondem a variações de sequência (polimorfismos), 2% correspondem a inserções/deleções *in frame* (não resultam em mudança na matriz de leitura durante a tradução), 2,8% são grandes inserções/deleções (que envolvem grande número de bases na sequência de DNA), 0,8% são ao nível da região promotora e 6,9% correspondem a alterações ainda desconhecidas (CFTR1, 2019). Embora extremamente raros, existem alguns casos reportados de FC associados à dissomia uniparental do cromossomo 7 (HEHR *et al.*, 2000; LE CAIGNEC *et al.*, 2007).

As mutações nesse gene são divididas em seis classes funcionais, de acordo com o efeito que causam no processo de formação da proteína (Figura 7). As classes I, II e III apresentam fenótipo mais grave, já que incluem mutações que levam à ausência ou à produção de proteína *CFTR* inativa (ZIELENSKI; TSUI, 1995). Mutações da classe I impedem o processo de tradução, ou seja, a proteína não é sintetizada. Atualmente, esta classe foi subdividida em IA (onde não há produção de RNA) e IB (há produção de RNA, mas um códon de parada prematuro impede a formação da proteína) (DE BOECK; AMARAL, 2016; MARSON *et al.*, 2016). Mutações da classe II promovem o dobramento errôneo da proteína e a incapacidade de deixar o retículo endoplasmático, onde é degradada. Nas mutações da classe III, a proteína chega até a membrana celular, mas não responde ao AMPc. Nas mutações classe IV, a proteína é transportada para a membrana e responde ao

estímulo, mas apresenta condutância diminuída. As mutações de classe V resultam em uma diminuição da quantidade de CFTR. E, finalmente, nas mutações de classe VI, a proteína é transportada para a membrana e responde ao estímulo, mas é degradada precocemente, permanecendo por pouco tempo na membrana plasmática (MISHRA *et al.*, 2005).

Figura 7 – Classes funcionais das mutações CFTR.



Fonte: Adaptado de Marson (2018).

A mutação mais frequente no gene *CFTR* é denominada F508del, uma deleção de 3 pares de bases no códon da fenilalanina na posição 508 do éxon 10. Pertencente à mutação de classe II, este mutante está presente em, aproximadamente, 70%-80% dos cromossomos de pacientes com FC brancos europeus (BALINSKY; ZHU, 2004). Essa mutação surgiu originalmente na Europa há 52 mil anos, sendo assim considerada como marcador genético de ascendência europeia (DAWSON; FROSSARD, 2000). Entretanto, a frequência relativa dessa mutação tem uma variabilidade muito grande entre diferentes regiões geográficas e distintos grupos étnicos. Seguindo a F508del, as mutações de FC mais frequentes na população mundial são: G542X (2,4%), G551D (1,6%), N1303K (1,3%) e

W1282X (1,2%) (CFTR1, 2019). Com exceção da mutação F508del, todas as outras ocorrem em frequências baixas e em mais de 90% das mutações a frequência é menor do que 1% (FRIEDRICH, 2007).

No Brasil, o diagnóstico molecular não é uma realidade no Sistema Único de Saúde (SUS) e poucos centros realizam os testes moleculares na rotina ambulatorial. O fato de ser um país com dimensões continentais e altamente miscigenado contribui para a diversidade de mutações encontradas nas diferentes regiões geográficas. A mutação, inicialmente, mais estudada no Brasil é a F508del, com frequência média é de 46% (REBRAFC, 2017), como demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2 -Heterogeneidade alélica no gene *CFTR* na população brasileira.

MUTAÇÃO	FREQUÊNCIA MUNDIAL	FREQUÊNCIA ALÉLICA NO BRASIL	ESTADO	ESTUDO
F508del	70,0%	45,0%*	RJ, SC, SP, MG, PR*	Raskin et al, 1999
		48,2%	Minas Gerais	Perone et al, 2010
		7,1%	Maranhão	Viana e Mesquita, 2003
		50,0%	Rio Grande do Sul	Friedrich, 2007
		22,7%	Pará	Araujo et al, 2005
		48,4%	São Paulo	Bernardino et al, 2000
		50,0%	São Paulo - Campinas	Coutinho et al, 2013
		45,5%	Paraná	Faucz et al, 2007
		48,7%	Rio Grande do Sul	Streit et al, 2003
		47,1%*	SC, PR, MG*	Raskin et al, 2003
		48,7%	Bahia	Mota et al, 2018
28,4%	Rio de Janeiro	Cabello et al, 2005		

Fonte: Adaptado de Mota e colaboradores (2015).

A análise molecular das mutações na FC é importante em algumas situações:

- em pacientes com diagnóstico estabelecido de FC, para indicação da medicina personalizada com os moduladores CFTR e determinação prognóstica (correlação genótipo-fenótipo), incluindo-se os estudos com genes modificadores;
- investigação de formas não típicas de FC/CFTR-RD;
- aconselhamento genético: quando um dos cônjuges tem FC ou é portador de mutação *CFTR*; e para indivíduos assintomáticos que são parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau dos indivíduos afetados;
- diagnóstico pré-natal/pré-implantacional: na futura gestação ou gestação atual, para casais que já têm filhos com FC; para casais

heterozigotos, se o teste não puder ser realizado em um filho com FC; em embriões de casais heterozigotos; ou quando o feto apresenta intestino hiperecogênico, dilatação das alças intestinais, retardo de crescimento ou supercrescimento sugestivo de dissomia uniparental (ATHANAZIO, 2017).

2.4.3 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO NA FC

As classes funcionais das mutações no gene *CFTR* explicam parcialmente a relação entre o genótipo e o fenótipo. Sabe-se que pacientes portadores de duas mutações de classe I a III tendem a exibir um fenótipo mais grave, geralmente associado à IP, doença pulmonar mais grave, maior frequência de íleo mecônio, de desnutrição, de doença hepática grave e mortalidade precoce. Já pacientes que têm mutações de classe IV a VI geralmente apresentam sintomas mais leves da doença, sobrevida mais longa e SP (MCKONE *et al.*, 2006). No entanto, esses conceitos não se aplicam a todos os casos e não devem ser usados para previsões prognósticas, pois existem, por exemplo, pacientes portadores de mutações classe IV a VI que apresentam formas graves da doença e vice-versa (CASTELLANI *et al.*, 2008).

O potencial de uma mutação para causar doença mais ou menos grave depende de múltiplos fatores: tipo de mutação, mecanismo molecular em nível celular, posição no gene, local de expressão (órgãos específicos), alelos complexos e a influência de outras mutações (ZIELENSKI, 2000). Além disso, temos a influência de genes modificadores e fatores ambientais, que podem atenuar ou agravar o quadro clínico (KEREM; KEREM, 1996).

Segundo descrito no CFTR2, as mutações *CFTR* estão agrupadas em quatro grupos, de acordo com as consequências clínicas previstas:

- i) Mutação causadora de FC: quando em trans com outra mutação que causa FC, resulta em doença;
- ii) Mutação de consequência clínica variada: a mutação possui expressão ou penetrância variável e quando em trans com outra mutação que causa FC pode resultar em FC ou em um CFTR-RD, ou não ter a doença;

- iii) Mutação que não causa FC: quando em trans com outra mutação causadora de FC não resulta em doença. Porém, isso não exclui a possibilidade dessa mutação contribuir para as características clínicas da FC em certos indivíduos;
- iv) Mutação de significado clínico incerto: mutações que não foram totalmente analisadas ainda.

Apesar de a FC ser uma doença monogênica autossômica recessiva, ela tem elevada variabilidade fenotípica de difícil explicação. Estudos de associação ambiental e de moduladores gênicos vêm sendo realizados (STANKE *et al.*, 2010). Um dos fatores não-*CFTR* diretamente relacionado com a apresentação clínica é a adesão ao tratamento, o ambiente (como observado em indivíduos expostos ao tabaco, bem como à contaminação por agentes poluentes do ar). Além disso, outros fatores podem ser apontados, como a de colonização bacteriana, sendo de efeito ainda desconhecido, mas com provável significância na perda da função pulmonar (DAVIES *et al.*, 2005; COLLACO; KUTTING, 2008).

Genótipo *CFTR* e Função Pulmonar:

A doença pulmonar é a principal causa de morbidade e mortalidade na FC, ocorrendo em cerca de 90%. Logo, uma previsão do prognóstico individual destes sintomas seria muito útil e importante no manejo dos pacientes. Entretanto, de todos os órgãos envolvidos na FC, o pulmão é o que apresenta maior variabilidade da gravidade da doença. Fatores não relacionados ao *CFTR*, como: genes modificadores, adesão ao tratamento, fatores ambientais e sociais contribuem para essa heterogeneidade clínica (VANSCOY, 2007).

Pacientes com mutações graves tendem a ter função pulmonar mais baixa, com um declínio mais rápido no VEF₁ e doença pulmonar mais grave do que os pacientes que têm mutações moderadas ou leves. No entanto, existem pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para mutações de classe I a III que apresentam doença pulmonar relativamente leve, enquanto pacientes portadores de pelo menos uma mutação IV a VI podem desenvolver manifestações respiratórias

graves. Deste modo, é difícil prever, de forma confiável, a gravidade da doença pulmonar baseada apenas no genótipo *CFTR* (GEBOREK; HJELTE, 2011).

Genótipo *CFTR* e Função Pancreática:

Devido à ampla capacidade funcional do sistema exócrino, a IP ocorre quando menos de 5% do pâncreas exócrino está funcionando. A partir de então, a terapia de reposição enzimática é necessária para prevenir má absorção de gordura e consequente desnutrição (LITTLEWOOD *et al.*, 2006).

Mutações graves nos dois alelos tendem a estar associadas à IP, enquanto que, quando há pelo menos uma mutação de classe IV a VI, geralmente, os pacientes são suficientes pancreáticos. O que se observa é que as mutações que resultam em SP apresentam um mecanismo dominante, ou seja, a presença de apenas uma mutação moderada ou leve no genótipo é suficiente para preservar parcialmente a função pancreática. No entanto, essas correlações não são absolutas e algumas mutações podem estar relacionadas à suficiência ou insuficiência pancreática, independentemente da classe funcional (DURNO *et al.*, 2002). A SP está associada a um melhor estado nutricional, mas também a um risco de 15 a 20% de ocorrência de pancreatite (AUGARTEN *et al.*, 2008).

Logo após a clonagem do gene *CFTR*, a IP foi encontrada em praticamente todos os milhares de pacientes com FC homocigotos para F508del (BORGIO *et al.*, 1990; KEREM *et al.*, 1990; JOHANSEN *et al.*, 1991; KRISTIDIS *et al.*, 1992), confirmando a alta relação entre o funcionamento do pâncreas e o genótipo *CFTR*. Várias mutações leves já foram associadas à SP na literatura, dentre elas: G85E, G91R, R117H, E193K, P205S, R334W, T338I, R347H, R347L, R347P, R352Q, A455E, S492F, S549N, P574H, D579G, 711p5G>A, C866Y, F1052V, H1054D, R1066H, R1068H, H1085R, D1152H, S1159P, S1251N, F1286S, G1349D, 2789p5G>A e 3849p10kb C>T (CUTTING *et al.*, 1990; CREMONESI *et al.*, 1992; KEREM *et al.*, 1989c).

Genótipo *CFTR* e Infertilidade Masculina:

A *CFTR* parece ser decisiva no desenvolvimento dos vasos deferentes. Uma alteração relativamente pequena da sua função está associada à CBAVD, que é encontrada na grande maioria dos pacientes do sexo masculino com FC. Pequeno número de pacientes apresenta algum grau de fertilidade; esta característica foi associada a mutações específicas e, em particular, com a mutação 3849+10kbC>T. (CASTELLANI *et al.*, 2008).

A influência que fatores não-*CFTR* causam no fenótipo é específica para cada órgão, sendo o ducto deferente o menos afetado e o pulmão amplamente afetado (ZIELENSKI, 2000).

Genótipo *CFTR* e Outras Manifestações Clínicas:

A doença hepática e o IM ocorrem quase exclusivamente em pacientes portadores de mutações classes I a III. O alto risco de recorrência familiar de IM (29-39%) é sugestivo de predisposição genética, que indica esta complicação poder ser influenciada por fatores outros, além do genótipo *CFTR* (BLACKMAN *et al.*, 2006; CASTELLANI *et al.*, 2008).

No fígado, também se supõe que outros fatores não-*CFTR* modulem a expressão da proteína *CFTR* em pacientes com FC. Gabolde colaboradores (2001) indicaram que mutações no gene da lectina estão associadas ao maior risco de doença hepática grave em pacientes com FC. A doença hepática está fortemente associada ao estado pancreático e, em alguns casos, com o IM. Portanto, pacientes com doença hepática tendem a apresentar mutações de efeito grave, que são altamente associadas à IP (CUTTING, 2005).

O comprometimento endócrino do pâncreas - diabetes relacionada à FC - é característico em pacientes com IP, que por sua vez está fortemente associado a mutações de classes graves (KOCH *et al.*, 2001; CASTELLANI *et al.*, 2008).

Alelos Complexos:

Se as duas mutações *CFTR* estão no mesmo gene parental, diz-se que estão em *cis*; se cada mutação estiver em um gene parental diferente, diz-se que eles estão em *trans*. Quando as duas mutações estão em *cis*, a FC pode não ser confirmada e a busca por outra mutação, localizada em *trans* em relação às outras duas, deve continuar. Alelos complexos ocorrem quando duas mutações estão em *cis*, ou seja, estão no mesmo gene do mesmo cromossomo (CASTELLANI *et al.*, 2008).

Embora a maioria dos casos de alelos complexos apresente associação benigna com a mutação real causadora de doença, existem situações em que a segunda mutação pode modular o efeito da mutação principal. Em 1991, Dork e colaboradores descreveram o primeiro alelo complexo em FC, onde a mutação R553Q foi detectada no mesmo alelo que a F508del, de um paciente que também era portador da mutação R553X. Este paciente apresentava IP e doença pulmonar grave, porém, o teste do suor era limítrofe, sugerindo que a mutação R553Q, de alguma forma, modulava a gravidade da doença normalmente associada a F508del.

Os alelos complexos mais compreendidos do gene *CFTR* são as associações das variantes 5T-13TG, 5T-12TG e 5T-11TG (introns 8), com R117H-T5 e R117H-T7, e das mutações I148T e 3199del6 (CASTELLANI *et al.*, 2008).

O polimorfismo 5T-13TG ou 5T-12TG encontrado em heterozigidade composta com uma mutação causadora de FC pode resultar em CFTR-RD ou em uma forma leve da FC. Quando a mutação R117H é detectada, o polimorfismo 5T e 7T também devem ser pesquisados. Em heterozigose composta com uma mutação que causa FC, ou na homozigose, o complexo R117H-5T geralmente resulta em FC suficiente pancreático, enquanto o R117H-7T pode resultar em uma forma leve da FC, CBAVD ou não causar doença. Já a variante I148T sozinha é um polimorfismo neutro que não causa FC (CASTELLANI *et al.*, 2008).

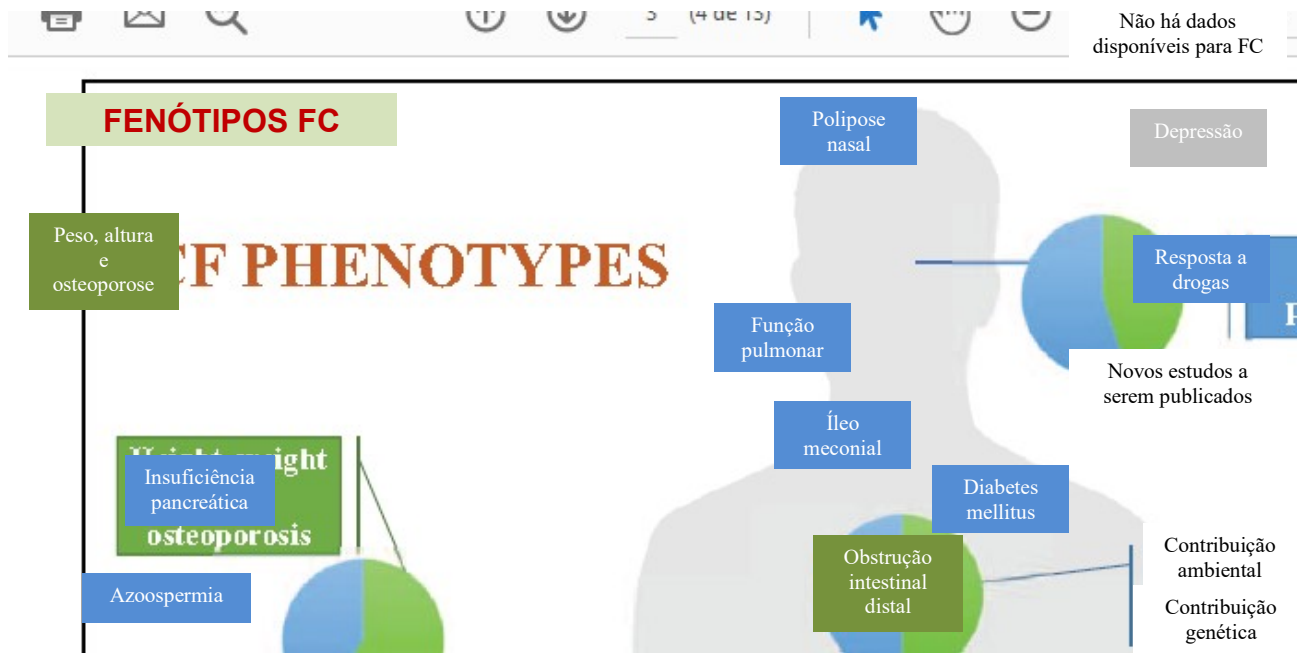
2.4.4 GENES MODIFICADORES

Uma grande e importante variabilidade fenotípica é observada entre pacientes que apresentam a mesma classe de mutação no gene *CFTR* e, até mesmo, entre pacientes que apresentam a mesma mutação, portanto, fatores genéticos secundários podem modificar o fenótipo da FC. Esses fatores genéticos secundários, que modulam a gravidade da doença, são chamados de genes modificadores (SLIEKER *et al.*, 2005)

Um gene modificador é diferente daquele gene principal que determina a doença. Ele está envolvido na variação da expressão fenotípica da doença (SOFERMAN, 2006). Esses genes podem estar envolvidos em processos intracelulares onde o gene primário é expresso. Produtos dos genes modificadores podem afetar o *splicing*, a transcrição, a tradução, o transporte de proteínas, a glicosilação ou outros processos pós-traducionais, mas também, a expressão, a degradação e a secreção proteica. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) funcionais ocorrem nesses genes modificadores, alterando o fenótipo da doença. Esses SNPs funcionais podem ser encontrados na região promotora de um gene modificador, afetando a taxa de transcrição; em um éxon, afetando a estrutura ou função da proteína; ou dentro de um intron, interferindo no mecanismo de *splicing* (SLIEKER *et al.*, 2005).

Em estudos com gêmeos, Mekus e colaboradores (2000) sugeriram um componente genético secundário que, associado às mutações do gene *CFTR* e ao fator ambiental, atua como modulador da gravidade clínica da doença. Desde então, muitos genes moduladores relacionados à gravidade clínica estão sendo estudados e descritos (CUTTING, 2010). Essa relação é estabelecida com a hipótese de esses genes participarem na fisiopatologia da doença como: inflamação, fibrose, defesa do hospedeiro, transporte de íon ou qualquer outra perturbação da homeostase existente na FC, e também por terem polimorfismos identificados (SLIEKER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2008). O fenótipo clínico dos órgãos é influenciado de maneiras diferentes pelos fatores genéticos e ambientais, com representado na Figura 8.

Figura 8- Contribuições genéticas e ambientais nos fenótipos clínicos em pacientes com FC.



Fonte: Adaptado de Marson (2018).

Alguns genes modificadores já possuem sua ação associada à FC (Tabela 1). Além destes, outros genes modificadores já foram descritos, como: *TGF β1*-Fator transformador de crescimento β 1 (doença pulmonar) (COLLACO; CUTTING, 2008); *MBL*– manosebinding lectin, *NOS1*-nitric oxide synthase 1, *HLA*-human leukocyte antigen, *TNF*- fator de necrose tumoral, *GST*-glutathione S-transferase, *ACE*-enzima conversora da angiotensina 1 (remoção mucociliar, danos do tecido epitelial e seu reparo); *MBL*, *HLA*, *ACE*(modulam a proteólise e a fibrose gastrointestinal) (SLIEKER *et al.*, 2005); Receptor α 2adrenérgico(regulação da função da proteína CFTR); *TNF α* -Fator de necrose tumoral α , *TGF β* - Fator transformador de crescimento β , *Glutathione S-transferases*, α 1*antitripsina*, α 1*antiquimotripsina*, *MIF* - Fator inibidor da migração de macrófagos (regulação da inflamação); *MBL*, *HLA*, *NOSs* - Sintetases de óxido nítrico, *IL-10* – Interleucina 10 (modulação da infecção) (HULL; THOMSON, 1998; ARON *et al.*, 1999; MAHADEVA *et al.*, 2001; BÜSCHER, 2006; OLIVEIRA, 2008).

Tabela 1 - Alguns estudos sobre genes modificadores.

Study	Gene	Variants	Outcome
Marson <i>et al.</i> [23]	<i>ADRB2</i>	Arg16Gly (rs1042713) and Glu27Gln (rs1042714)	Arg16Gly assoc pulmonary fun and response haplotype asso
Lima <i>et al.</i> [24]	<i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i>	Deletion	No association v
Marson <i>et al.</i> [25]	<i>ACE</i>	Deletion/insertion	Association with presence of <i>Bt</i>
Furgeri <i>et al.</i> [26]	<i>TCF7L2</i>	IVS4G > T (rs12255372)	No association v
Rezende <i>et al.</i> [27]	<i>ADRA2A</i>	rs553668 and rs10885122	rs553668 was c age at diagno individually ar Shwachman–l
Marson <i>et al.</i> [31]	<i>ADIPOR</i>	315 base deletion and 134 base insertion	315 base deletic insertion was c was associate
Coutinho <i>et al.</i> [32]	<i>TNFα</i>	-238A > G (rs361525) and -308G > A (rs1800629)	-238A > G, no c was associate first <i>P. aerugin</i>
Marson <i>et al.</i> [33]	<i>GCLC</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i>	<i>GCLC</i> (-129C > T and -3506A > G); deletion of <i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i> ; <i>GSTP1</i> (+313A > G)	<i>GCLC</i> -129C > T 3506A > G w deletion of <i>GS GSTP1</i> +313/ <i>GSTT1</i> with ac
Furlan <i>et al.</i> [34 [■]]	<i>IL8</i>	rs4073, rs2227306 and rs2227307	rs2227307 was age. The prese rs2227306 ar the studied po
Pereira <i>et al.</i> [36 [■]]	<i>SLC6A14</i> , <i>SLC26A9</i> , <i>SLC11A1</i> and <i>SLC9A3</i>	<i>SLC6A14</i> (rs3788766), <i>SLC26A9</i> (7512462), <i>SLC11A1</i> (rs17235416) and <i>SLC9A3</i> (rs17563161)	rs3788766 was <i>aeruginosa</i> , fu function tests c osteoporosis, l associated wit tests and respo associated wit
Marson <i>et al.</i> [37 [■]]	125 genes	251 variants	Many genes wer

Fonte: Marson (2018).

Estudos sobre a identificação desses genes modificadores são importantes, pois podem ser úteis de várias maneiras, uma vez que podem fornecer pistas para o entendimento de mecanismos patogênicos da doença. Tendo em vista que a gravidade clínica está associada à classe de mutação presente no gene *CFTR* e que a FC apresenta expressividade variável, ou seja, pacientes que apresentam a mesma mutação podem expressar fenótipo e/ou gravidade diferenciada (CORREIA, 2005). O conhecimento integral das bases genéticas da doença pode, também, contribuir futuramente para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias (ACCURSO; SONTAG, 2008).

2.5 DIAGNÓSTICO

Por se tratar de uma doença multissistêmica, o diagnóstico da FC deve ser feito o mais precocemente possível, em virtude, principalmente, do prognóstico e de suas implicações genéticas, familiares e correlações socioeconômicas (VALENTIM, 2008). De acordo com o *Cystic Fibrosis Foundation*, nos Estados Unidos, o diagnóstico da FC já consegue ser confirmado em 71% dos pacientes ao completarem o primeiro ano de vida. Porém, existem poucos trabalhos que analisam a população de pacientes com FC nos países em desenvolvimento, como o Brasil. O REBRAFC divulgou, em 2017, que a média de idade ao diagnóstico era 5,74 anos (DP: 10,50), mediana, 0,85 anos (0,17 – 7,15).

O diagnóstico inicial da FC inclui a presença de uma ou mais manifestações clínicas características, como: doença sinusal/pulmonar crônica; anormalidades nutricionais/gastrointestinais; síndromes perdedoras de sal; azoospermia obstrutiva; a triagem neonatal positiva; história familiar da doença em irmão. Apresentando uma dessas características, o diagnóstico é confirmado por exames que evidenciam disfunção da proteína CFTR. Destes, o padrão ouro é o teste do suor (cloro acima de 60 mEq/L), realizado em duas ocasiões diferentes (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2019), ou pela identificação de duas mutações patológicas no gene ou pela diferença de potencial nasal alterada (DEBOECK *et al.*, 2006; FARREL *et al.*, 2008). Com o crescente desenvolvimento da tecnologia na área médica, o

diagnóstico já pode ser realizado em várias oportunidades: pré-natal, quando já houver casos na família (por biopsia de vilosidade coriônica, seguida de análise genética); e no primeiro ano de vida, por manifestações precoces (como IM) (SANTOS *et al.*, 2005).

O exame utilizado para a triagem neonatal é a dosagem quantitativa da tripsina Imunorreativa (TIR), avaliada no sangue usando radioimunoensaio, baseando-se no refluxo de enzimas pancreáticas para o sangue, decorrente da obstrução dos ductos (ponto de corte no Brasil: 70ng/mL). Crianças com FC apresentam elevações persistentes de TIR (CORREIA, 2005; AUDREZET *et al.*, 2008). Embora este teste tenha uma eficiência de 95,3%, deve haver uma confirmação do resultado através do teste molecular ou do teste do cloro no suor, porque existe a possibilidade de falsos positivos (0,5%) e/ou negativos (até 20%) (RYLEY *et al.*, 1992).

No Brasil, a Portaria nº. 822, de 6 de junho de 2001, do Ministério da Saúde, incluiu a FC para triagem neonatal na rede pública (teste do pezinho), englobada entre as doenças da Fase III (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, anemia falciforme e hemoglobinopatias e FC). Contudo, somente há pouco tempo, quase duas décadas após o decreto, a triagem foi implantada em todos os estados (porém, com algumas limitações), sendo que, na Bahia, a implantação ocorreu em 2013 (BRASIL, 2001).

O exame padrão ouro para o diagnóstico da FC é o teste do cloro no suor, com elevada sensibilidade e especificidade (>95%), baixo custo e pelo fato de não ser invasivo (VALENTIM, 2008). A técnica utiliza a dosagem quantitativa de cloro no suor, obtidos pelo método da iontoforese por pilocarpina, descrito por Gibson e Cooke (1959). O exame é realizado pela estimulação das glândulas sudoríparas pela aplicação de pilocarpina em área de pele do antebraço, com coleta de suor para iontoforese (ALVAREZ, 2002). O resultado é considerado positivo quando a concentração de Cl^- é maior que 60mEq/L. Nos casos duvidosos, o valor encontrado está entre 30 e 59 mEq/L e o exame deve ser repetido (CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2019). O teste normal não exclui o diagnóstico de formas não clássicas da FC e o diagnóstico deve ser confirmado pela investigação genética e/ou pelos sinais clínicos, pois, apesar de ser o teste padrão ouro, existem casos de falso-positivo (até 15%) e falso-negativo (até 12%) (VALENTIM, 2008).

A Diferença de Potencial Nasal (DPN) aumentada, em associação com quadro clínico ou história familiar positiva, fundamenta o diagnóstico de FC. O exame de DPN é um teste dinâmico, no qual se verifica, em nível celular, a função da proteína CFTR. Consiste em aferir, ao mesmo tempo, o potencial elétrico no epitélio nasal e no antebraço do paciente, gerando assim uma diferença de potencial. Durante o teste, o epitélio nasal é exposto a quatro tipos de soluções e, de acordo com a reação a cada uma delas, é possível obter o resultado. As anormalidades do transporte iônico no epitélio respiratório na FC estão associadas com um padrão alterado na DPN. Especificamente, três características distinguem a FC: a) uma DPN basal mais elevada; b) uma maior inibição da DPN, após a perfusão nasal com amilorida; c) pouca ou nenhuma alteração na DPN, após a perfusão do epitélio nasal com uma solução livre de Cl^- em conjunção com isoproterenol. Entretanto, a ausência de aumento na DPN não exclui o diagnóstico de FC, pois um resultado falso-negativo pode ocorrer na presença do epitélio inflamado. É recomendado que a DPN seja avaliada pelo menos duas vezes em momentos diferentes. Porém, essa técnica só está disponível em centros altamente especializados e requer uma padronização rigorosa (YANKASKAS *et al.*, 2004).

A investigação genética é realizada pela determinação de mutações nos dois alelos, em que os pacientes podem ser homocigotos afetados (portadores de uma mesma mutação nos dois alelos do gene *CFTR*) ou heterocigotos compostos (com duas mutações diferentes no gene *CFTR*) (DE BOECK *et al.*, 2006). Sua aplicação é muito importante em algumas situações, como: diagnóstico incerto; forma não clássica da doença; pacientes com forte suspeita clínica, mas com testes do suor negativos; além de ser útil para conhecimento do painel de mutações que causam a FC para cada população, com valor prognóstico e epidemiológico, identificando portadores de alelos da FC e permitindo a identificação de mutações raras no gene *CFTR* (PARAD *et al.*, 2005). Uma vez confirmado a FC e definido seu genótipo, pode-se, em muitos casos, ter uma projeção sobre a evolução da doença e de possíveis complicações, informações que poderão ajudar a nortear a condução do tratamento (VALENTIM, 2008). Os laboratórios de países desenvolvidos, que oferecem diagnóstico molecular para FC, analisam um painel com número reduzido de mutações ou então sequenciam todo o gene, o que não é realidade em países

como o Brasil, onde somente poucos laboratórios particulares utilizam essas técnicas e com custos elevados. Na grande maioria, o número de mutações estudadas ainda é limitado, sendo a F508del a mais pesquisada (MOTA, L. *et al.*, 2016)

Existem outros exames complementares que avaliam a função da CFTR e são uteis no diagnóstico, principalmente nos casos em que o teste do suor é inconclusivo (duvidoso ou negativo). Entre eles estão: a biopsia retal (que avalia o defeito de transporte de íons nos tecidos nativos recém puncionados, onde a secreção de Cl⁻ está reduzida, enquanto a de Na⁺ e dos nutrientes ligadas ao Na⁺ estão aumentadas (MALL *et al.*, 1998a; MALL *et al.*, 1998b); e a evaparietria (realizado após estimulação β -adrenérgica da glândula sudorípara, com posterior medição da taxa de suor na pele – onde portadores de FC não apresentam sudorese após o estímulo, pacientes com uma mutação apresentam cerca de 50% de sudorese e os pacientes sem nenhuma mutação possuem a curva de sudorese semelhante a da fase colinérgica) (QUINTON *et al.*, 2012).

Existem outras características menos específicas da FC por serem comuns a outras doenças. Alguns exames não são tão específicos, mas podem ajudar a elucidar o diagnóstico, como por exemplo: radiografia do tórax, teste de função pulmonar, bacteriologia respiratória, determinação da quimi tripsina ou elastase fecal, espermograma, avaliação urogenital e testes da função pancreática (REIS; DAMACENO, 1998; DE BOECK *et al.*, 2006).

O diagnóstico da FC, apesar de difícil, vem crescendo no Brasil. Isto se deve a um maior conhecimento e à preocupação relacionada à doença em escolas médicas; à divulgação para a população em geral, por meio de campanhas de esclarecimentos (como o Dia Nacional de Divulgação e Conscientização da Fibrose Cística); bem como o avanço das técnicas moleculares e médicas (VALENTIM, 2008). Porém, as medidas de saúde pública e o tratamento oferecido aos pacientes ainda são baseados em dados internacionais, sem considerar as peculiaridades de cada local (ALVAREZ *et al.*, 2004). No entanto, após a implantação da triagem neonatal em alguns Estados, essa realidade já está sendo modificada.

2.6 TRATAMENTO

Por se tratar de uma doença multissistêmica, a terapia deve ser conduzida por equipe multidisciplinar. O tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível e deve ser individualizado, já que cada paciente apresenta um padrão único de expressão dos sintomas. O tratamento tem como objetivo retardar as lesões causadas pela doença, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes (ALVAREZ, 2002).

A administração de antibióticos, anti-inflamatórios e técnicas de limpeza das vias aéreas, visam à prevenção das lesões pulmonares. O paciente também deve ser submetido a programas de fisioterapia respiratória, realizar alguma atividade física regular, além de fazer uso de antibióticos ou drogas orais, como broncodilatadores (WELSH *et al.*, 2001; BARTH, 2004). Os pacientes que apresentam manifestações de IP devem ser tratados com reposição enzimática. As doses são ajustadas individualmente, em função da ingestão calórica e do peso de cada paciente (ALVAREZ, 2002).

É importante observar que o gasto calórico é elevado mesmo em pacientes FC com doença pulmonar leve. Por esse motivo, é indicado que, juntamente com a reposição enzimática, deve-se tratar a deficiência nutricional que é comprometida pela combinação de: 1) demanda calórica basal aumentada; 2) aumento da demanda calórica pela doença pulmonar crônica; 3) dificuldade para manter balanço calórico positivo pela má-absorção intestinal; 4) desnutrição acentuada em pacientes com inflamação ativa pulmonar. O somatório desses fatores pode tornar muito difícil a manutenção de peso normal para altura, então a dieta deve ser livre, mas com alto teor de gordura e acréscimo de sal (REIS; DAMACENO, 1998; ALVAREZ, 2002).

Embora o tratamento requeira alguns cuidados especiais das crianças com FC - tomar muitos medicamentos, submeter-se a uma dieta hipercalórica, fazer exercícios e fisioterapia -na atualidade, elas geralmente ficam fora do hospital, vão à escola e, na medida do possível, vivem vidas normais (BONADIA, 2011). Segundo dados do estudo de Davis (2006), nos EUA, em 2005, mais de 35% dos pacientes com FC apresentavam idade superior a 18 anos. O último relatório do REBRAFC

(2017) relata que a sobrevida dos pacientes diagnosticados foi de 43,8 anos. A perspectiva é que pacientes com FC nascidos na década de 1990 viverão até os 40 anos e os que estão nascendo agora com a doença tenham expectativa de vida superior aos 50 anos. Assim, muitos pacientes irão precisar de orientação médica durante a vida adulta (ELBORN; SHALE; BRITTON, 1991; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2019).

O custo médio do tratamento é elevado e difícil de ser estimado. Por este motivo, independentemente da renda familiar, os pacientes e suas famílias têm garantido o direito de receber assistência do governo, via Sistema Único de Saúde (SUS), ao qual compete o diagnóstico precoce, por meio do teste do pezinho, até o fornecimento de suplementos alimentares, enzimas digestivas e medicamentos (ROSA *et al.*, 2008). Também é importante que todos os estados brasileiros realizem estudos sobre a triagem neonatal, pois a formulação de uma política pública direcionada a esses pacientes somente será possível a partir do momento em que se conheça a real incidência da doença no país.

Os mais recentes progressos nas estratégias de tratamento estão focados na identificação de compostos que atuem diretamente no defeito molecular que causa a doença, restaurando o transporte de íons. Existem dois tipos de moduladores (potencializadores e corretores). Os potencializadores melhoraram a função da proteína CFTR, expressa na membrana plasmática (mutações de classe III a VI), enquanto os corretores melhoram a proteína CFTR anormal, que não é expressa na membrana celular (mutações classe I e II). Os medicamentos desenvolvidos até o momento são eficazes apenas para mutações específicas. Há quatro fármacos moduladores da CFTR disponíveis no mercado: Ivacaftor (Kalydeco®), Lumacaftor/Ivacaftor (Orkambi®), Tezacaftor/Ivacaftor (Symdeko™) e Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor (Trikafta™) (VERTEX PHARMACEUTICALS, 2019). O Quadro 3 descreve a indicação de uso para cada medicação.

Quadro 3- indicação de uso para medicações moduladoras para FC.

	Indicação ANVISA	Indicação FDA
ORKAMBI Lumacaftor + Ivacaftor	- Pacientes homocigotos para F508del - Idade: > 6 anos	- Pacientes homocigotos para F508del - Idade: > 2 anos
KALYDECO Ivacaftor	- Pacientes com pelo menos um alelo: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549R ou R117H - Idade: > 6 anos	- Pacientes com pelo menos um alelo: E56K, P67L, R74W, D110E, D110H, R117C, R117H, G178R, E193K, L206W, R347H, R352Q, A455E, S549N, S549R, G551D, G551S, D579G, 711+3A>G, E831X, S945L, S977F, F1052V, K1060T, A1067, G1069R, R1070Q, R1070W, F1074L, D1152H, G1244E, S1251N, S1255P, D1270N, G1349D, 2789+5G>A, 3272-26A>G, 3849+10kbC>T - Idade: > 12 meses
SYMDEKO Tezacaftor + Ivacaftor	Não aprovado neste momento	- Pacientes homocigotos para F508del ou - Pacientes com pelo menos um alelo: E56K, P67L, R74W, D110E, D110H, R117C, A455E, E193K, L206W, R347H, R352Q, D579G, 711+3A>G, E831X, S945L, S977F, F1052V, K1060T, A1067, R1070W, F1074L, D1152H, D1270N, 2789+5G>A, 3272-26A>G, 3849+10kbC>T - Idade: > 12 meses
TRIKAFTA Ivacaftor + Tezacaftor + Elexacaftor	Não aprovado neste momento	- Pacientes com a mutação F508del em pelo menos um alelo - Idade \geq 12 anos.

Fonte: Vertex Pharmaceuticals (2019).

O Ivacaftor é um potencializador, inicialmente estudado em pacientes com a mutação G551D (classe III). O uso desse medicamento demonstrou redução nos níveis de cloro no suor, melhora do VEF₁ e ganho de peso. Além disso, houve redução do número de exacerbações e aumento da qualidade de vida. Posteriormente, a indicação desse medicamento foi ampliada para outras mutações de classe III a IV (VAN GOOR *et al.*, 2014).

O Lumacaftor foi o primeiro corretor CFTR testado em indivíduos homozigotos para a mutação F508del (classe II). A resposta clínica nesses pacientes não foi significativa, evidenciando que o Lumacaftor não foi eficaz como um único agente. Portanto, a associação Ivacaftor/Lumacaftor (potenciador/corretor) foi testada em pacientes com essa mutação e demonstrou uma redução no número de exacerbações, com uma ligeira melhora no VEF₁ e qualidade de vida para pacientes homozigotos, mas sem efeitos significativos sobre heterozigotos (WAINWRIGHT *et al.*, 2015). A partir de 2015, o uso dessa combinação foi aprovado para pacientes homozigotos F508del (DE BOECK; AMARAL, 2016).

Tezacaftor/ivacaftor é outra opção de tratamento para pacientes homozigotos para F508del, que não são indicadas a tomar Lumacaftor/Ivacaftor. Ele é outro corretor que age da mesma maneira que o Lumacaftor, mas a combinação Tezacaftor/Lumacaftor parece não causar as interações medicamentosas causadas por Lumacaftor/Ivacaftor. Além disso, Tezacaftor/Lumacaftor também está aprovado para pacientes com apenas uma das 26 mutações específicas descritas na bula (KEATING *et al.*, 2018).

O Trikafta é um corretor de última geração que consiste na combinação tripla de Ivacaftor, Tezacaftor e Elexacaftor, indicado para o tratamento de FC em pacientes com 12 anos ou mais e que tenham pelo menos uma mutação F508del (HOLGUIN, 2018).

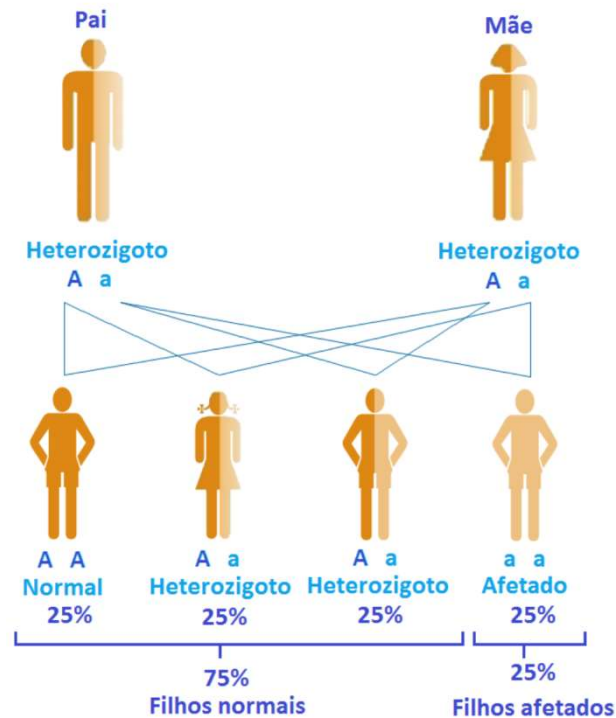
Outros potenciais moduladores da CFTR estão em estudo para ampliar o rol de mutações elegíveis para uso das medicações (VERTEX PHARMACEUTICALS, 2019).

2.7 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Aconselhamento genético (AG) é o processo de conscientização de indivíduos para entenderem e se adaptarem às implicações médicas, psicológicas e familiares da contribuição genética de uma doença. O processo de AG envolve a confirmação do diagnóstico, estimativa do risco de recorrência, fornecimento de informações sobre a doença, apoio à aceitação do diagnóstico, disponibilização de tratamento (quando indicado), e apresentação de alternativas para a prevenção, como o diagnóstico pré-natal e o diagnóstico pré-implantacional (RESTA *et al.*, 2006; SARAIVA-PEREIRA *et al.*, 2011), além de ajudar os pacientes a interpretar os resultados de exames genéticos, visando à melhor adaptação possível, de acordo com as suas decisões (DEMSEY, 1999).

As doenças genéticas com padrão de herança autossômico recessivo, como a FC, são relativamente raras na população, pois para manifestar a doença os indivíduos afetados devem apresentar mutações nos dois alelos do gene *CFTR*. Portanto, se ambos os pais de um afetado são portadores (heterozigotos), o risco de recorrência da FC é de 25% para seus próximos filhos e a probabilidade de nascer um filho saudável, contudo portador, é de 50% (Figura 9). As doenças autossômicas recessivas são normalmente observadas em um ou mais irmãos, mas não em gerações anteriores. Homens e mulheres são afetados em igual proporção (LEWIS, 2004; DE LUCA; MENEZES; OCAMPOS, 2008; SARAIVA-PEREIRA *et al.*, 2011). Portanto, é fundamental que seja realizado o AG informando aos pais os riscos de recorrência da FC para futuras gestações.

Figura 9- Representação esquemática do padrão de herança da FC.



Fonte: www.nanocell.org.br

Apesar de já existirem testes genéticos de rastreamento completo do gene (como o sequenciamento), deve-se ter muito cuidado em fazer previsões sobre uma determinação genotípica, uma vez que fatores ainda não completamente claros podem levar os pacientes a ter evoluções clínicas não compatíveis com os padrões supostamente previstos. A expressão da doença pode variar de evoluções fatais muito rápidas a quadros clínicos muito brandos para o mesmo subgrupo genético. As informações obtidas a partir dos testes genéticos devem ser compartilhadas com outros parentes, a fim de que novos aconselhamentos genéticos possam ocorrer (VALENTIM, 2008).

Uma alternativa aos casais portadores de uma mutação *CFTR* é o diagnóstico genético pré-implantacional (DPI), que permite identificar alterações cromossômicas ou gênicas nos embriões antes da sua implantação em fertilização assistida. O primeiro caso de bebê saudável após o DPI para FC foi publicado em 1992 por

Handyside e colaboradores. No DPI, como somente uma célula é analisada, existe a possibilidade de um resultado falso negativo (1 a 5 %) (SIMPSON, 2010).

3.1 OBJETIVO GERAL

Em uma população pediátrica com Fibrose Cística assistida no Ambulatório Multidisciplinar do Complexo Hospitalar Prof Edgard Santos, entre 2005 e 2019:

- 1- Determinar o perfil genótipo;
- 2- Caracterizar fenotipicamente.

4 MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, descritivo de corte transversal.

4.2 PACIENTES

Amostra de conveniência, composta por todos os pacientes acompanhados no AMFC desde 2005 até 2019, com FC confirmada por dois testes do suor e/ou duas mutações patogênicas no gene *CFTR*.

Todos os responsáveis assinaram o TCLE, aprovado pelo CEP do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, sob número: 121/2011.

Após a admissão dos pacientes no estudo, foi aplicado um formulário padrão para a obtenção de informações clínico-epidemiológicas. Os pacientes realizaram coleta de uma amostra de sangue periférico para análise pontual de sete mutações (F508del, G542X, G551D, R334W, R1162X, 3120+1G>A e R553X) através de técnicas convencionais. Quando duas mutações não foram encontradas, uma análise secundária por sequenciamento de nova geração foi realizada (através do swab bucal). Os pacientes que ainda permaneceram com o genótipo indefinido seguiram para análise molecular por MLPA.

4.3 VARIÁVEIS

Foram estudadas as seguintes variáveis clínico/demográficas: idade dos pacientes na admissão do estudo, no início dos sintomas e ao diagnóstico; grupo racial; consanguinidade entre os pais; motivos que levaram ao diagnóstico; presença de sintomas respiratórios; história de IM; esteatorreia; IP (identificada através da pesquisa da elastase fecal); dificuldade em ganhar peso no momento do diagnóstico; uso de enzimas pancreáticas; função pulmonar; infecções por *Pseudomonas aeruginosa* e os níveis de Cl⁻ no suor.

4.3.1 Caracterização de grupo racial

Os pacientes foram classificados pelo mesmo avaliador, como brancos ou não brancos, de acordo com as características fenotípicas descritas por Parra *et al.*, 2003.

CAPÍTULO I

REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS

Periódico: Revista de ciências médicas e biológicas

Ano de Publicação: 2016

Tipo: Artigo original

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MUTAÇÃO F508DEL: UMA SÉRIE DE CASOS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Laís Ribeiro Mota¹, Maria Betânia Pereira Toralles^{2*}, Edna Lucia Souza³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

²Doutora em Medicina e Saúde. Professora Associada IV do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA

³Doutora em Medicina e Saúde. Professora Associado II do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA.

***Correspondente**

Maria Betânia Pereira Toralles – Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. – Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador – BA.CEP:40110-100– Tel: (71) 99965-9211 – E-mail: m.toralles@uol.com.br

RESUMO

Introdução: a Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum e letal na população de origem caucasóide. Causada por mutações no gene que codifica a proteína CFTR, no qual já existem mais de 2.000 mutações identificadas, sendo a mutação F508del a mais frequente. Esta doença apresenta-se de forma multissistêmica com quadro clínico altamente variado e com considerável diversidade na gravidade e na progressão da doença. Alguns estudos correlacionam os sintomas ao genótipo dos pacientes. **Objetivo:** descrever o genótipo e apresentação clínica dos pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para esta mutação F508del. **Metodologia:** foi realizada a descrição de uma série de casos de pacientes diagnosticados com FC que possuem a mutação F508del, acompanhados pelo Ambulatório Multidisciplinar de FC do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos do Estado da Bahia. **Resultados:** Dez (45,4%) crianças eram homocigotos para a mutação e 12/22 (54,5%) heterocigotos compostos. As principais manifestações clínicas que levaram ao diagnóstico foram: insuficiência pancreática (95,4%), sintomas respiratórios (85,2%), dificuldade em ganhar peso (88,5%), esteatorreia (73,3%), e ritmo intestinal alterado (53,8%). A idade de início dos sintomas (mediana 0,16 anos) e do diagnóstico (mediana 0,58 anos) foram precoces, refletindo a gravidade da doença. **Conclusões:** Conclui-se que as características clínicas e laboratoriais dos pacientes descritos foram semelhantes aos relatados na literatura e destacam a associação entre insuficiência pancreática e o genótipo dos pacientes, enfatizando a importância do estudo genético na determinação do prognóstico dos pacientes, em especial em populações altamente miscigenadas, como no Brasil.

Descritores: Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística, Mutações, Genótipo.

ABSTRACT

Introduction: cystic fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disorder in Caucasian populations and occurs as a result of mutations in *CFTR* gene, which codifies the transmembrane protein known as CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Currently, more than 2.000 mutations have been described and the F508del mutation is the most frequent among patients with CF. This is a multisystemic disease with wide variability in clinical manifestations and in severity and disease progression. Some studies correlate the genotypes with symptoms in CF patients. **Objectives:** to describe the genotypes and clinical manifestations for the F508del mutation in patients who are homozygous or heterozygous. **Methods:** it was a case series report of CF patients followed in a Multidisciplinary clinic at The Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos in the State of Bahia. **Results:** for the F508del mutation, ten (45.4%) children were homozygous and 12/22 (54.5%) heterozygous. The main clinical manifestations during diagnosis were: pancreatic insufficiency (95.4%), respiratory symptoms (86.9%), weight gain difficulty (85.8%) and steatorrhea (77.5%). The median age of first symptoms (0.16 years) and at diagnosis (0.56 years) was early, which highlights the disease severity. **Conclusions:** the clinical manifestations were similar to those described in the literature and highlight the association between pancreatic insufficiency and patients genotypes, as well as emphasize the importance of a genetic study in the disease prognosis, particularly in high admixture population as in Brazil.

Keywords: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, Mutations, Genotype.*

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC; OMIM 219700) ou mucoviscidose é a doença autossômica recessiva mais frequente na população, sendo mais comum naqueles de origem caucasóide, apresentando-se como uma enfermidade multissistêmica¹. O gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (*CFTR*), localizado no braço longo do cromossomo 7 (*locus7q31*), é responsável pela codificação da proteína CFTR que atua como um canal de cloro. Mutações neste gene resultam na ausência ou função defeituosa da proteína CFTR^{2,3,4}. Estima-se que haja atualmente cerca de 70.000 afetados por esta doença, em todo o mundo⁵. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, existem, aproximadamente, 4 mil indivíduos acometidos pela FC⁶, com uma incidência próxima de 1:7000 nascidos vivos, sendo variável de acordo com a região geográfica⁷.

Existem mais de 2.000 mutações identificadas no gene *CFTR*⁸, as quais são classificadas em seis grupos tendo como base a funcionalidade da proteína, onde nas classes I, II e III não há síntese da proteína CFTR, o que acarreta maior gravidade clínica do que a observada nas classes IV, V e VI, onde há produção de uma CFTR defeituosa¹. A primeira mutação identificada e, também, a mais frequente mundialmente é a F508del, presente em cerca de 70% dos casos de FC, dependendo da população analisada, variando de 26% na Turquia até 88% na Dinamarca⁸. Esta é uma mutação da classe II e ocorre devido à deleção de três pares de bases no exón 10, resultando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508, ocasionando o dobramento errôneo da CFTR e, posteriormente, sua degradação no retículo endoplasmático rugoso⁹. Em países economicamente desenvolvidos e com etnias/raça bem definidas é possível identificar mais facilmente todas as mutações presentes no gene *CFTR* dos pacientes, porém, em populações em desenvolvimento e/ou miscigenadas como a brasileira a caracterização genotípica é mais complexa. No Brasil, a frequência média da F508del é 50%, variando de 8,7% a 50%^{10,11,12,13,14,15,16,17}, a depender da região avaliada.

Segundo o IBGE¹⁸, no Estado da Bahia 80% dos habitantes são afrodescendentes, apresentando altas taxas de miscigenação, especialmente

entredescendentes de europeus e de africanos. Apenas dois estudos pesquisaram a mutação F508del em pacientes fibrocísticos baianos. Acosta et. al (2007).¹⁰ encontraram frequência alélica de 8,7%, enquanto Mota (2015)¹³ encontrou 25,5%.

A FC apresenta-se como uma enfermidade multissistêmica com quadro clínico altamente variado e os pacientes são diagnosticados, com considerável diversidade na gravidade e na progressão da doença ¹⁹. Alguns estudos vêm tentando relacionar os sintomas ao genótipo dos pacientes, porém uma importante variabilidade fenotípica é observada entre pacientes da mesma classificação mutacional e, até mesmo, entre pacientes que apresentam a mesma mutação ²⁰. Devido à alta frequência e gravidade clínica associada à mutação F508del, o objetivo deste estudo foi descrever o genótipo e apresentação clínica dos pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para esta mutação acompanhados pelo Ambulatório Multidisciplinar de FC do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos do Estado da Bahia.

METODOLOGIA

Modelo do estudo

Trata-se de uma série de casos de pacientes diagnosticados com FC e que apresentam a mutação F508del, oriundos de um estudo de coorte que acompanha indivíduos de 0 – 20 anos atendidos no AMFC desde 2008.

Pacientes

Os pacientes do estudo receberam diagnóstico clínico de FC de acordo com os critérios da *Cystic Fibrosis Foundation* ⁵. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, sob o número 121/2011. Os pais e/ou responsáveis de todas as crianças incluídas no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a admissão dos pacientes no estudo, foi aplicado um formulário padrão, de onde foram obtidas informações clínico-epidemiológicas. Os pacientes realizaram coleta de uma amostra

de sangue periférico para análise da mutação F508del, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Adicionalmente, as mutações G542X e 3120+1G→A foram pesquisadas de acordo com as técnicas específicas.

Variáveis clínico/demográficas

Foram estudadas as seguintes variáveis clínico/demográficas: idade dos pacientes na admissão do estudo de coorte, no início dos sintomas e ao diagnóstico, etnia/raça, consanguinidade entre os pais, sintomas respiratórios, história de IM, esteatorreia, IP (identificada através da pesquisa da elastase fecal), dificuldade em ganhar peso no momento do diagnóstico, uso de enzimas pancreáticas e os níveis de Cl⁻ no suor.

Análise dos Dados

Os dados obtidos foram registrados e armazenados em um banco de dados utilizando o programa Epidata. A análise descritiva incluiu cálculos de médias, medianas e frequências simples e relativas das variáveis estudadas.

RESULTADOS

Características da População de Estudo

Cinquenta e três pacientes foram incluídos no estudo de coorte até o presente. Destes, 22 (41,5%) apresentaram a mutação F508del e tinham dois testes de suor em que os níveis de Cl⁻ foram elevados (≥ 60 mmol/L). Treze dos 22 (59%) eram do sexo masculino. De acordo com as características fenotípicas da criança e/ou dos pais, todos os pacientes foram classificados como não brancos (miscigenados).

Análise da mutação F508del

Dez (45,4%) crianças eram homozigotos para a mutação e 12/22 (54,5%) heterozigotos compostos, estes foram subdivididos em indivíduos heterozigotos com as duas mutações caracterizadas e heterozigotos compostos com apenas a mutação F508del identificada até o momento. A Tabela 1 descreve o genótipo e as variáveis clínicas dos pacientes.

Tabela 1 - Genótipo e variáveis clínicas dos 22 pacientes com a mutação F508del acompanhados pelo AMFC em Salvador, 2012 a 2016.

Genótipos	N (%)	Classe Mutacional	Mediana de idade (anos) no início dos sintomas	Mediana de idade (anos) no momento do diagnóstico
			IIQ (Min-Max)	IIQ (Min-Max)
F508del/F508del	10 (45,4%)	II	0,08(0,08-7)	0,58(0,25-10)
F508del/G542X	1 (4,5%)	II/I	0,16(0,08-2)	0,5(0,08-4,9)
F508del/3120+1G→A	6 (27,4%)	II/I		
F508del/?	5 (22,7%)	II/?	0,25(0,08-2)	4,75(0,5-15,8)

IIQ: intervalo interquartil; Min: mínima; Max: máxima.

Características clínico-demográficas da população Estudada

A mediana de idade (em anos) dos pacientes no início dos sintomas e no momento do diagnóstico foram, respectivamente, 0,16 (0,08 – 7) e 0,7 (0,08 – 15,8). A Tabela 2 compara os principais sintomas que levarão ao diagnóstico dos pacientes homocigotos e heterocigotos compostos para a mutação F508del. As principais manifestações clínicas registradas foram: insuficiência pancreática (IP) observada com base em seus dados clínicos e/ou confirmação laboratorial (95,4%), dificuldade em ganhar peso (88,5%), sintomas respiratórios (85,2%), esteatorreia (73,3%) e ritmo intestinal alterado (53,8%). Nenhum dos 22 pacientes tinha histórico de íleo meconial. Havia história de consanguinidade entre os pais de dois (2/22) pacientes homocigotos (9%), para a mutação F508del e entre seis pacientes (primos e irmãos): três (F508del/F508del) e três (F508del/3120+1G→A). Entre os 22 pacientes estudados apenas um paciente não teve evidências clínicas nem confirmação de IP e não fazia uso de enzimas pancreáticas. Vinte e uma crianças continuam sendo acompanhadas e um paciente homocigoto foi a óbito por desidratação antes do segundo ano de vida.

Tabela 2- Principais sintomas apresentados pelos pacientes com a mutação F508del que levaram ao diagnóstico da Fibrose Cística no AMFC em Salvador, 2012 a 2016.

Sintomas	Homozigotos F508del	Heterozigotos com a 2ª mutação identificada	Heterozigotos compostos com a 2ª mutação não identificada
Sintomas respiratórios	9/10 (90%)	6/7 (85,7%)	4/5 (80%)
Dificuldade ganho peso	8/10 (80%)	6/7 (85,7%)	5/5 (100%)
Esteatorreia	8/10 (80%)	7/7 (100%)	2/5 (40%)
Insuficiência Pancreática	7/7 (100%)*	7/7 (100%)	4/5 (80%)
Ritmo Intestinal Alterado	7/10 (70%)	5/7 (71,4%)	1/5 (20%)

*3 pacientes não realizaram.

DISCUSSÃO

Além da mutação F508del, os pacientes foram investigados para as mutações: G542X e 3120+1G→A. A F508del é a mutação mais frequente no gene *CFTR*, tendo surgido originalmente, na Europa 52 mil anos atrás, sendo assim considerada um marcador genético de ascendência europeia²¹. A G542X é a segunda mutação mundialmente mais frequente, ocorre pela substituição de um aminoácido Glicina por um código de parada no códon 542 do exón 11e é frequente na população espanhola^{22,23}. A 3120+1G→A, é uma mutação de *splicing* que leva ao processamento incorreto do RNAm no introns 16, sendo a segunda mais prevalente em americanos afrodescendentes, perdendo em frequência apenas da F508del²⁴. Dörket et al.²⁵ encontraram haplótipos idênticos do *CFTR* para os alelos 3120+1G→A entre os africanos, árabes e afroamericanos, sugerindo que a mutação possuiu origem ancestral comum. Estes pesquisadores chegaram à conclusão que essa mutação é muito antiga e deve ser mais comum do que se imaginava em populações de áreas tropicais e sub-tropicais, onde a FC ainda é subdiagnosticada, como o Brasil.

A presença destas três mutações nos pacientes estudados reforça a alta miscigenação da população brasileira, especialmente a baiana, que apresenta uma grande contribuição de imigrantes europeus, principalmente portugueses, espanhóis e italianos, na constituição da população, levando a uma grande variedade étnica nesse estado²⁶. Raskin et al.²⁷ sugerem que mesmo os brasileiros que são fenotipicamente não-brancos na aparência e se consideram de origem não-

européia não pode ser completamente livres de miscigenação europeia e vice-versa, o que pode ser constatado neste estudo, onde pacientes não brancos com franca ascendência africana tiveram a mutação F508del identificada. Entretanto, foi extremamente difícil classificar a raça no presente estudo, uma vez que existe um alto grau de miscigenação nessa população, sendo esperada uma grande variabilidade genotípica nestes pacientes com consequente heterogeneidade clínica da doença.

É importante ressaltar que os pacientes estudados apresentaram início muito precoce dos sintomas (mediana 0,16 anos). Dez (45%) crianças tinham sintomas desde o primeiro mês de vida e apenas 4 (18%) apresentaram manifestações clínicas a partir dos 2 anos de idade, o que deve refletir a gravidade da doença. Alvarez et al.²⁸ encontraram grande variação de idade do início dos sintomas desde o nascimento até 20 anos, com mediana de 3 meses em pacientes do sudeste brasileiro. No presente estudo, a mediana de idade dos pacientes no diagnóstico foi 0,58 anos (variando desde um mês até 15 anos), sendo que o tempo mediano entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 5 meses. A mediana (p25-p75) de idade em anos 0,58 (0,31 – 5,6) no momento do diagnóstico foi inferior àquela do Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2013 (REBRAFC)²⁹, em que a mediana (p25-p75) foi 1,47 anos (0,25 – 7,35), e aproxima-se do registro americano 5, onde a mediana de idade dos pacientes foi cinco meses. A semelhança entre estes dados se deve, possivelmente, por este estudo analisar apenas pacientes com ao menos uma mutação de classe grave, onde os quadros clássicos da doença são comuns, contribuindo para um diagnóstico mais precoce. Bem como, pela alta frequência, próxima de 70%, da mutação F508del nos pacientes fibrocísticos daquele país³⁰.

A mediana de início dos sintomas foi menor nos pacientes homocigotos quando comparados aos heterocigotos e, também, nos pacientes heterocigotos com as duas mutações identificadas em comparação aos heterocigotos compostos com apenas a mutação F508del identificada. É possível que a segunda mutação ainda desconhecida neste subgrupo seja de uma classe funcional de menor gravidade, levando à doença mais branda, com consequente início dos sintomas e diagnósticos mais tardios.

As principais manifestações clínicas apresentadas pelos 22 pacientes estudados estão próximas daquelas observadas em outros trabalhos nacionais e internacionais. Alvarez et al.²⁸ encontraram as manifestações respiratórias e digestivas em 89,4% e 59,6% dos pacientes, respectivamente, como principais sintomas que levaram ao diagnóstico na Região Sudeste brasileira. No presente estudo, a insuficiência pancreática e ritmo intestinal alterado foram observados, respectivamente, em 95,4% e 53,8% dos casos. Gibson et al.³¹, relataram que na maioria dos casos de fibrose cística nos Estados Unidos, o diagnóstico foi baseado nos sintomas respiratórios (43,8%), atraso no crescimento (29,3%), esteatorreia (24,4%) e íleo mecônio (18,5%). No presente estudo, os sintomas respiratórios, dificuldade em ganho de peso e esteatorreia foram sintomas comuns, ocorrendo respectivamente em 85,2%, 88,5%, 73,3% dos pacientes. Não houve relato de íleo meconial em nenhum paciente neste estudo. O genótipo do *CFTR* também está associado ao transporte iônico através do epitélio intestinal, porém sua correlação com o desenvolvimento de complicações intestinais, como o íleo meconial, em pacientes com FC ainda é pouco clara³².

A IP foi observada em 21/22(95,5%) dos pacientes, e apenas um paciente heterozigoto composto com a segunda mutação não identificada possui suficiência pancreática, semelhante à literatura, onde King et al.³³ encontraram esse sintoma em 88% dos indivíduos analisados. A função pancreática na FC é altamente associada ao genótipo apresentado. Pacientes com suficiência pancreática têm pelo menos uma mutação moderada, enquanto pacientes com insuficiência pancreática são geralmente homozigotos ou heterozigotos compostos para duas mutações de efeito grave, apresentando sintomas da FC clássica³², como observado no presente estudo. Corroborando com a literatura, Keremet al.³⁴ encontraram esta característica, à época do diagnóstico, em 99% dos pacientes homozigotos para a mutação F508del, em 72% dos heterozigotos compostos, e em apenas 36% dos pacientes com outras mutações. Estes autores observaram, também, que os pacientes com essa mutação foram diagnosticados em uma idade mais precoce. A doença hepática está altamente associada com a função pancreática e, em alguns casos, com íleo meconial. Deste modo, pacientes com doença hepática tendem

aapresentar mutações de efeito grave, que estão altamente associadas à insuficiência pancreática³².

CONCLUSÕES: Apesar das limitações, inerentes ao modelo do estudo, conclui-se que as características clínicas e laboratoriais dos 22 pacientes fibrocísticos com a mutação F508del foram semelhantes às descritas na literatura. Entretanto, a ausência de íleo meconial foi marcante neste trabalho. Estes resultados também permitem corroborar literatura que destaca a associação entre insuficiência pancreática e o genótipo dos pacientes e enfatizam a importância do estudo genético na determinação do prognóstico dos pacientes, em especial em populações altamente miscigenadas como no Brasil.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer aos pacientes com fibrose cística e suas famílias por permitir que este estudo fosse realizado. Além disso, eles são gratos aos profissionais do ambulatório multidisciplinar do Hospital da Universidade Federal da Bahia pela prestação de assistência aos pacientes, a professora Renata Lúcia Ferreira de Lima e a graduanda Paloma Horejs Bittencourt pela ajuda durante a realização dos testes moleculares e preparação deste manuscrito.

Financiamento parcial: FAPESB.

REFERÊNCIAS

1. WELSH, M. J. et al. **The metabolic and molecular bases of inherited diseases**. New York: McGraw-Hill, 2001.
2. KEREM, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science.**, Washington, v. 245, n. 4922, p. 1073-1080, Sept. 1989.
3. RIORDAN, J.R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. **Science.**, Washington, v. 245, n.4922, p. 1066-1073, Sept. 1989.
4. ROMMENS, J. M. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science.**, Washington, v. 245, n.4922, p. 1059-1065, Sept. 1989.
5. CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. 2019. Disponível em: <www.cff.org>. Acesso em: 04 jul. 2016.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 338 de 29 de junho de 2005. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/PT-338.htm>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
7. WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis**. Disponível em: <<http://www.who.int/genomics/publications>>. Acesso em: 17 jul. 2016.
8. CYSTIC Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>. Acesso em: 25 jul. 2016.
9. KO, Y.H. et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Over expression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n.32, p. 24330-24338, 1993.
10. ACOSTA, F. M. M. et al. Low frequency of the deltaAF508 mutation of the CFTR gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil. **Hum. Biol**, Detroit, v. 79, n. 3, p. 293-297, 2007.

11. VIDIGAL, P.V.T. et al. $\Delta F508$ del in a heterogeneous cystic fibrosis population from Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 8, p. 643-647, 2008.
12. CABELLO, G. M. K. et al. The3120+1G→a splicing mutation in CFTR is common in Brazilian. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 73, n. 3, p. 403-409, 2001.
13. MOTA, L. R. **Estudo de mutações no gene CFTR em pacientes com fibrose cística de um centro universitário de referência em Salvador-BA.** 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Biodiversidade) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
14. BIEGER, A. M.; MARSON, F.A.L.; BERTUZZO, C. S. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. **J. Pediatr.** Rio de Janeiro, v. 88, n. 6, p. 531-534, 2012.
15. OKAY, T. S. et al. Frequency of the $\Delta F508$ mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. **Clinics**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 131-134, 2005.
16. PERONE, C. et al. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 43, n.2, p. 134-138, 2010.
17. COUTINHO, C.A.A.C. et al. Mutações no gene cystic fibrosis transmembrane conductance regulator em um centro de referência para a fibrose cística. **J Bras Pneumol**, v. 39, n. 5, p. 555-561, 2013.
18. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 maio 2016.
19. MISHRA, A.; GREAVES, R.; MASSIE, J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. **Clin. Biochem.**
20. SLIEKER, M.G. et al. Disease modifying genes in cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.** Utrecht, v. 4, supl. 2, p. 7-13, 2005.

21. DAWSON, K. P.; FROSSARD, P. M. The geographic distribution of cystic fibrosis mutations gives clues about population origins. **Eur. J. Pediatr.**, Heidelberg, v. 159, n.7, p. 496-499, jul. 2000.
22. ZIELENSKI, J.; TSUI, L. P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. **Ann. Rev. Genet**, Palo Alto, v. 29, p. 777-807, 1995
23. LUCA, G. R. de; MENEZES, M. A.; CAMPOS, M.O. Genética e diagnóstico molecular. In: LUDWIG NETO, N. **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. Florianópolis:Secretaria de Estado de Saúde, 2008.
24. MACEK JUNIOR, M. et al. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. **Am. J. Hum. Genet**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 1122-1127, May 1997.
25. DÖRK, T. et al. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+1G-to-A in diverse populations. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 656-662, 1998.
26. TAVARES, L.H.D. **História da Bahia**. 8.ed. São Paulo: Ática, 1987.260 p.
27. RASKIN, S. et al. High allelic heterogeneity between African-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. **GenetTest.**, New York, v. 7, n. 3, p. 213-218, 2003.
28. ALVAREZ, A. E. et al. Fibrose Cística em um centro de referênciano Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J. Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 371-379, 2004.
29. REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSE CÍSTICA (REBRAFC). 2013. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2013_Portugues_site.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2016.
30. BOBADILLA, J. L. et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations- correlation with incidence data and application to screening. **Hum. Mutat.**, New York, v. 19, n. 6, p. 575-606, June 2002.

31. GIBSON, R. L.; BURNS, J. L.; RAMSEY, B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 168, n. 8, p. 918-951, 2003.
32. CUTTING, G. R. Modifier genetics: cystic fibrosis. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, Palo Alto, v. 6, p. 237-260, 2005.
33. KING, S. J. et al. Reduced bone density in cystic fibrosis: DF508 mutation is an independent risk factor. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v.25, n. 1, p. 54-61, 2005.
34. KEREM, B. et al. Identification of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Estados Unidos, v. 87, n. 81, p. 8447-8451, 1990.

CAPÍTULO II
Archives of Pulmonology and Respiratory Care

Periódico: Archives of Pulmonology and Respiratory Care

Ano de Publicação: 2017

Tipo: Carta ao editor

A importância do estudo genético na Fibrose cística

Laís R. Mota¹, Renata Lúcia L. F. de Lima², Edna Lúcia Souza^{3,4*}

¹Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

²Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia

³Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia

⁴Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia

***Correspondente**

Edna Lúcia Souza, Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Avenue Santa Luzia, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brasil.

Email: souza.ednalucia@gmail.com, ednalu@ufba.br

A Fibrose Cística (FC) é a doença genética de herança autossômica recessiva mais comum e letal em euro-descendentes. Afeta cerca de 85.000 pessoas em todo o mundo [1]. Caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas que afetam, principalmente, glândulas sudoríparas, pulmões e pâncreas exócrino, entretanto, apresenta, uma grande variabilidade na sua gravidade [2]. É causada por mutações no gene *CFTR* que codifica a proteína Reguladora Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR), localizado no cromossomo 7 (locus 7q31), levando a ausência ou perda da função da CFTR que, em condições normais, atua como um canal de cloro [3].

No presente, mais de 2.000 mutações no gene *CFTR* foram identificadas, das quais, cerca de 300 foram caracterizadas como definitivamente patogênicas [4]. Dentre estas, a deleção de 3 pares de bases na posição 508 da fenilalanina (F508del) é a mais frequente e presente em cerca de 80% dos pacientes em todo o mundo, sendo mais comum em euro-descendentes [1]. As mutações no gene *CFTR* são categorizadas em seis classes funcionais, de acordo com a alteração na proteína CFTR. Nas classes I, II e III, não há produção da proteína, acarretando doença de maior gravidade enquanto que nas classes IV, V e VI, a proteína produzida é defeituosa, mas existe alguma função [2]. Contudo, essa classificação vem sendo repensada, sendo proposta uma sétima classe funcional, que contemplaria grandes deleções no gene [4].

Desde a descoberta do gene *CFTR*, houve um grande progresso na compreensão da patogênese da FC, o que tem permitido o surgimento de diversos avanços terapêuticos para a doença, incluindo o uso de mucolíticos, antimicrobianos inaláveis e antiinflamatórios sistêmicos, que vêm aumentando a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes. Entretanto, avanços têm sido alcançados na busca de drogas que possam atuar diretamente no defeito molecular na doença. Atualmente, existem dois tipos de tratamentos moduladores da CFTR (potencializadores e corretores) liberados para uso pela Food and Drug Administration (FDA), que têm como alvo o transporte defeituoso de íons nos seus vários estágios de comprometimento [4]. Os potencializadores aumentam a função da proteína CFTR que é expressa na membrana plasmática (mutações de classes III

a VI), enquanto os corretores corrigem defeitos da proteína que não é expressa na membrana da célula (mutações de classes I e II) [4].

O Ivacaftor é um potencializador, inicialmente estudado em pacientes portadores da mutação G551D (classe III). O uso desta droga em pacientes com FC demonstrou redução dos níveis de cloro no suor e melhora no VEF1 e no ganho ponderal; além disso, observou-se redução do número de exacerbações e melhoria da qualidade de vida [5]. Posteriormente, as indicações para uso desta droga foram ampliadas para outras mutações e, mais recentemente, sua utilização foi aprovada para utilização em outras mutações das classes III e IV [4]. Atualmente, estudos estão em andamento para a possível utilização do Ivacaftor em outras mutações de classes II, IV e V [4].

O Lumacaftor foi o primeiro corretor da CFTR testado em indivíduos homocigotos para a mutação F508del (classe II). A resposta clínica nestes pacientes foi pouco significativa, evidenciando-se que o lumacaftor não foi eficaz como agente único. Então, a associação Ivacaftor/Lumacaftor (potencializador/corretor) foi testada em pacientes com esta mutação, demonstrando-se redução no número de exacerbações, melhora discreta no VEF1 e na qualidade de vida para pacientes homocigotos, mas sem efeitos significativos para heterocigotos [6]. Desde 2015, o uso dessa associação foi aprovado pela FDA para pacientes homocigotos para F508del [4].

O início dos sinais e sintomas da FC pode variar, ocorrendo desde as primeiras semanas de vida até a fase adulta. As manifestações pulmonares, gastrintestinais, o atraso de crescimento e desenvolvimento, associadas a testes de cloro no suor positivos (acima de 60 mEq/L), são consideradas apresentações clássicas da doença [7]. Entretanto, as manifestações clínicas da doença podem estar presentes apenas em um dos órgãos ou sistemas, associadas a valores de testes de cloro no suor normais ou duvidosos (30 a 60 mEq/L), caracterizando a FC atípica [7]. O estudo das mutações no *CFTR* tem grande importância para o diagnóstico destas formas da doença.

O alto grau de variabilidade da expressão da FC entre indivíduos com o mesmo genótipo sugere que, além da variação da gravidade produzida pelos efeitos das

diferentes mutações e de polimorfismos intragênicos no gene *CFTR*, outros elementos genéticos como polimorfismos em genes não *CFTR*, mediadores inflamatórios ou responsáveis pela resposta inata, estariam modulando a expressão dessa doença [8].

Nos últimos anos, estudos com genes candidatos a modificadores vêm sendo realizados, para tentar associar a relação da variabilidade genótipo/fenótipo. Alguns genes já foram associados às manifestações clínicas: doença pulmonar obstrutiva (*TGFβ1*, *MBL2*, *EHF*, *APIP*, *SLC9A3*, *SLC6A14*, *MC3R*, *CASS4*, *AURKA*); obstrução intestinal (*MSRA*, *SLC6A14*, *SLC9A3*); diabetes-relacionada a FC (*TCF7L2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *SLC26A9*); infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (*MBL2*, *DCTN4*, *SLC6A14*); baixo IMC (Chr1p36.1 e Chr5q14) [8]. Além disso, o ambiente também pode ser um modificador da doença. Estes achados enfatizam, cada vez, mais a importância de uma medicina personalizada para o diagnóstico e tratamento da FC.

Com o aumento na expectativa de vida dos pacientes com FC, muitas mulheres têm alcançado a idade reprodutiva. Os homens com a doença apresentam infertilidade secundária à azoospermia obstrutiva, mas também podem ter filhos, com o auxílio de técnicas de reprodução humana assistida [7]. O risco de uma pessoa com FC ter filhos afetados depende de seu parceiro, logo, além dos demais benefícios do estudo de mutações no gene *CFTR* já descritos, o aconselhamento genético (AG) também tem grande importância. O AG além de contribuir no entendimento da FC e das implicações médicas, psicológicas e familiares, integra o fornecimento de informações sobre a doença (como a estimativa do risco de recorrência para gestações futuras tanto do casal como para outros membros da família), apoio à aceitação do diagnóstico e apresentação de alternativas para a prevenção (como o diagnóstico pré-implantacional) [7].

Desta forma, a relevância do estudo genético na FC pode ser resumida como: a) em pacientes com diagnóstico estabelecido de FC, para indicação de terapia mutação-específica e determinação de prognóstico (correlação genótipo-fenótipo), incluindo o estudo dos genes modificadores não-*CFTR*; b) investigação de formas atípicas da FC; c) aconselhamento genético, quando um dos cônjuges tem FC ou é portador assintomático de mutação no gene *CFTR* e para indivíduos assintomáticos

que são parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau de indivíduo afetado; d) diagnóstico pré-natal/pré-implantação de FC: em futura gestação ou na gestação atual, para casais que já têm filho (s) com FC e para casais heterozigotos se o teste não pode ser feito em um filho com FC, em embriões de casais heterozigotos ou quando o feto apresentar intestino hiperecogênico, dilatação de alças intestinais, retardo de crescimento ou supercrescimento sugestivo de dissomia uniparental [7].

REFERÊNCIAS

1. Zolin A, van Rens J, Fox A, Iansa P, Preftitsi A, et al. (2010) ECFS PatientRegistry Annual Data Report. Karup: European Cystic Fibrosis Society. Link: <https://goo.gl/vixn3J>
2. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic Fibrosis. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors (New York: McGraw-Hill), 5121-80.
3. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080. Link: <https://goo.gl/wM3WZm>
4. De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. Lancet Respir Med 4: 662-674. Link: <https://goo.gl/jbkzG4>
5. Van Goor R, Yu H, Burton B, Hoffman BJ (2014) Effect of Ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. J Cyst Fibros 13: 29–36. Link: <https://goo.gl/VmdDWH>
6. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, et al. (2015) Lumacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for phe508del CFTR. N Engl J Med 373: 220–231. Link: <https://goo.gl/bxfXgU>
7. Athanazio RB, da Silva Filho LVR, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, et al. (2017) Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. J Bras Pneumol 43: 219-245. Link: <https://goo.gl/wZMSMe>

8. Schram CA (2012) Atypical cystic fibrosis: identification in the primary care setting. *Can Fam Physician* 58: 1341-1345. Link: <https://goo.gl/8Fo89W>
9. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso R, et al. (2017) Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 181S: S4-15. Link: <https://goo.gl/Wmtv2A>
10. Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16: 45-56. Link: <https://goo.gl/ijhPcj>

CAPÍTULO III

Molecular Biology Reports

Periódico: Molecular Biology Reports

Ano de Publicação: 2018

Tipo: Relato de uma série de casos

**DESCRIÇÃO DE MUTAÇÕES RARAS E UMA NOVA VARIANTE EM PACIENTES
BRASILEIROS COM FIBROSE CÍSTICA: UMA SÉRIE DE CASOS DE UM
CENTRO DE REFERÊNCIA NO ESTADO DA BAHIA**

**Laís R. Mota¹, Valmir Machado de Melo Filho², Lorena L. de Castro², Daniel
Fantozzi Garcia³, Regina Terse-Ramos², Maria Betânia P. Toralles², Renata Lúcia
L. F. de Lima⁴, Edna Lúcia Souza^{2,5*}**

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

² Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia

³ Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia

⁵ Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia

***Correspondente**

Edna Lúcia Souza, Department of Pediatrics, School of Medicine of
Bahia, Federal University of Bahia, Avenue Santa Luzia, 379/902,
Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brasil.

Email: souza.ednalucia@gmail.com, ednalu@ufba.br

RESUMO

O conhecimento do perfil genético da fibrose cística (FC) contribui para uma melhor compreensão da relação genótipo/fenótipo, principalmente em populações miscigenadas como o Brasil. Descrever dados clínicos de pacientes com FC com mutações raras ou ainda não descritas no gene *CFTR* no Brasil. Trata-se de uma série de casos de pacientes com FC acompanhados em um centro de referência. Dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através de prontuários médicos. A análise molecular das mutações foi realizada por métodos convencionais e / ou por sequenciamento de nova geração. Foram estudados dez pacientes, sete tiveram cinco mutações patogênicas sem descrição anterior no Brasil (Q1100P, Y109C, A107P, E1409K e K162E), uma das quais ainda não foi relatada em pacientes com FC (A107P). Entre os sete pacientes, três (dois irmãos) tiveram o segundo alelo mutante de ocorrência rara entre pacientes brasileiros (G1069R e 2307insA). Três outros pacientes também tiveram pelo menos uma variante rara (V201M, S466X e G1069R). A idade do diagnóstico da FC variou de 1 a 190 meses nos dez casos e as principais manifestações clínicas foram sintomas respiratórios e dificuldade em ganhar peso. Todos, exceto um paciente, apresentaram dados clínicos e/ou laboratoriais compatíveis com insuficiência pancreática. A identificação de mutações raras ou ainda não descritas no *CFTR* em pacientes com FC no Brasil destaca a alta heterogeneidade genética nessa população. O conhecimento do perfil genotípico de pacientes brasileiros com FC pode contribuir para o desenvolvimento de painéis de mutação específicos para a investigação genética direcionada a cada região do país, além de ajudar a entender a complexa relação genótipo/fenótipo, especialmente em populações miscigenadas.

Palavras-chave: Mutação · Mucoviscidose · Genótipo · *CFTR*

INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é a doença genética autossômica recessiva mais comum entre caucasianos. É causada por mutações no gene *CFTR*, para o qual mais de 2000 variantes já foram descritas e distribuídas de maneiras diferentes nas várias regiões geográficas [1, 2]. O conhecimento do perfil genético contribui, entre outros fatores, para uma melhor compreensão da relação genótipo/fenótipo, particularmente em populações miscigenadas. Mais recentemente, a determinação do genótipo pode prever pacientes que podem se beneficiar do tratamento de precisão, já disponível para alguns indivíduos [3].

No Brasil, existe uma escassez no conhecimento do perfil genético da FC entre os Estados, uma vez que os estudos realizados estão concentrados nas regiões sul e sudeste, o que dificulta a generalização sobre o perfil clínico-epidemiológico e genético da doença no país [4], considerando as altas taxas de miscigenação da população brasileira. Uma estimativa das mutações mais prevalentes pode ser feita a partir dos dados anuais do Registro de Fibrose Cística (REBRAFC) [5], onde apenas 46% dos pacientes realizaram algum estudo genético. A mutação F508del foi a mais comumente detectada, com frequência alélica de 48,7%.

A Bahia, localizada no nordeste do Brasil, é um dos estados com as mais altas taxas de miscigenação devido a mais de cinco séculos de miscigenação étnica entre africanos, europeus e ameríndios [6]. Atualmente, apenas dois centros fornecem assistência aos pacientes com FC no estado e o perfil genético dessa população é apenas parcialmente conhecido [7]. Além disto, a triagem neonatal para FC através da dosagem de tripsina imunorreativa (TIR) foi iniciada na Bahia apenas em 2013, o que nos permite dizer que há subdiagnóstico da doença, especialmente considerando pacientes nascidos antes de 2012, bem como pela baixa suspeição clínica por pediatras, somada às múltiplas manifestações clínicas. Este estudo foi realizado em um Hospital Universitário, que é um dos dois centros médicos que prestam atendimento multidisciplinar a pacientes com FC no estado da Bahia. O objetivo deste estudo foi descrever as condições clínicas de pacientes com FC que apresentaram mutações raras ou ainda não observadas no gene *CFTR* no Brasil.

MÉTODOS

Este estudo é uma série de casos de pacientes diagnosticados com FC por dois testes do suor positivos, realizados de janeiro 2008 a dezembro de 2017 em um centro de referência que acompanha 51 pacientes com FC com até 20 anos de idade. Os dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos foram coletados de prontuários médicos. Após o diagnóstico de FC, todos os pacientes foram submetidos à análise molecular para determinar as mutações no gene *CFTR* por métodos convencionais (reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática), inicialmente foram pesquisadas sete mutações através de amostras de sangue periférico. Se dois alelos patogênicos não foram encontrados, uma análise secundária por sequenciamento de nova geração foi realizada para análise de todos os exons do *CFTR*. O sequenciamento foi realizado após construção da biblioteca usando um sequenciador Illumina HiSeq, pareados e leitura 2 × 75 bp. A análise das variantes genotipadas foi realizada através do alinhamento das sequências ao genoma humano de referência (hg19) usando o BWA-MEM e o Genome Analysis Toolkit (GATK), de acordo com as melhores práticas do Broad Institute, bem como genotipagem algorítmica de variantes de número de cópias (grandes inserções e duplicações). Anotação e previsão de patogenicidade das variantes foram obtidas usando o software Mendelics Abracadabra e as mutações identificadas foram comparadas às frequências populacionais.

RESULTADOS

Dez pacientes foram estudados, sete tiveram cinco mutações patogênicas sem descrição anterior no Brasil (c.3299A>C [Q1100P], c.326A>G [Y109C], c.319G>C [A107P], c.4225G>A [E1409K] e c.484 A>G [K162E]), um destas ainda não foi descrita em pacientes com FC em todo o mundo (A107P). Entre os sete pacientes, três (dois irmãos) tiveram o segundo alelo mutante de ocorrência rara no Brasil (c.3205G>A [G1069R] e c.2175_2176insA [2307insA]). Apenas um paciente era Q1100P homocigoto enquanto os outros eram heterocigotos compostos. Três

outrosDez pacientes foram estudados, sete tiveram cinco mutações patogênicasseem descrição anterior no Brasil (c.3299A> C[Q1100P], c.326A>G [Y109C], c.319G>C [A107P],c.4225G>A [E1409K] e c.484 A>G [K162E]), um destas ainda não foi descrita em pacientes com FC em todo o mundo (A107P).Entre os sete pacientes, três (dois irmãos) tiveram o segundoalelo mutante de ocorrência rara no Brasil (c.3205G> A[G1069R] e c.2175_2176insA [2307insA]). Apenas umpaciente era Q1100P homozigoto enquanto os outros eram heterozigotos compostos. Três outros pacientes também tiveram pelo menosuma variante rara (c.601G>A [V201M] e c.1397C>A[S466X], c.3205G>A [G1069R]). A tabela 1 apresenta osdados clínicos e laboratoriais dos dez pacientes com mutações ainda não descritas ou muito raras no Brasil.

Tabela 1 - Descrição do genótipo e fenótipo de dez pacientes com FC com mutações raras ou ainda não descritas entre pacientes brasileiros.

Dados Clínicos	Caso 1 Feminino	Caso 2 Feminino	Caso 3 ^f Feminino	Caso 4 ^f Feminino	Caso 5 Masculino	Caso 6 Masculino	Caso 7 Masculino	Caso 8 Masculino	Caso 9 Masculino	Caso 10 Masculino
Genótipo (Alelo1/ Alelo 2)	(Q1100P/Q1100P)	(Q1100P/N1303K)	(Y109C/G1069R) 5T/12TG	(Y109C/G1069R) 5T/12TG	(A107P/L206W)	(K162E/2307insA)	(F508del/E1409K)	(G1069R; TG11/5T - TG10-9T)	(G542X/V201M)	(F508/S466X)
Idade atual (em anos)	12 anos e 1 mês	2 anos e 8 meses	7 anos e 1 mês	2 anos e 9 meses	6 anos e 3 meses	3 anos e 1 mês	3 anos e 1 mês	3 anos e 5 meses	1 ano e 6 meses	18 anos e 6 meses
Idade Diagnóstico (em anos)	1 ano e 1 mês	5 meses	9 meses	2 meses	3 anos e 5 meses	4 meses	2 anos e 6 meses	1 ano e 6 meses	1 mês	15 anos e 8 meses
Motivo do diagnóstico	Sintomas respiratórios, ritmo intestinal alterado (esteatorreia, diarreia crônica) e dificuldade de ganho de peso	Sintomas respiratórios, diarreia com esteatorreia, doença hepatobiliar, dificuldade de ganho de peso, IRT elevada, distúrbio hidroeletrólítico, edema e anemia	Dificuldade de ganho de peso, desidratação e diarreia crônica	IRT elevada, história familiar e ritmo intestinal alterado	Sintomas respiratórios	Sintomas respiratórios, ritmo intestinal alterado (esteatorreia), desidratação, vômitos e regurgitações	Sintomas respiratórios e ritmo intestinal alterado (esteatorreia)	Retardo de crescimento e dificuldade de ganho de peso	IRT elevada	Sintomas respiratórios, ritmo intestinal alterado (esteatorreia), dificuldade de ganho de peso e dor abdominal
Tempo de Acompanhamento (em anos)	10 anos	2 anos e 5 meses	6 anos e 6 meses	2 anos e 9 meses	2 anos e 6 meses	2 anos e 10 meses	6 meses	6 meses	1 ano	2 anos e 10 meses
Estado Nutricional no Diagnóstico	Eutrófico	Muito baixo peso e baixa altura	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Desnutrido
Estado Nutricional Atual	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico	Eutrófico
Íleo meconial	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
CF Triagem Neonatal IRT > 70 ng/mL	Não realizou	IRT elevada (70)	Não realizou	IRT elevada (84)	Não realizou	IRT normal	IRT normal	IRT normal	IRT elevada (70)	Não realizou
Teste do Suor (mEq/L) ^a	111-106/115-98	102-96/86-84	111-92/87-92	70-65/74-71	73-70/78-81	66-69/75-79	71-70/69-66	69-72/54-58	67-62/60-63	105-102/106-102
Elastase Fecal (μ E1/g)	< 15,0	< 15,0	526,7	432,9	497,69	427,6	430,2	Não realizou	Não realizou	< 15,0
Presença atual de esteatorreia	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Use of enzymes	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Função pulmonar ^b	FEV ₁ : 2,92 (114%)	Não realizou	Não realizou	Não realizou	Não realizou	Não realizou	Não realizou	Não realizou	Não realizou	FEV ₁ : 3,46 (94%)
Infecção por <i>Pseudomonas</i>	Intermitente ^c	Livre de PA ^d	Nunca infectado	Nunca infectado	Nunca infectado	Nunca infectado	Nunca infectado	Intermitente ^c	Livre de PA ^d	Crônico ^e
Idade da primeira colonização	8 anos	1 anos	---	---	---	---	---	29 meses	---	---

^a Os resultados expressam os níveis de suor Cloro n nos dois testes que levaram ao diagnóstico de FC; ^b Realizado apenas em crianças com mais de 6 anos; ^c Mais de 1 episódio das culturas positivas em 12 meses; ^d Apenas 1 episódio das culturas positivas em 12 meses; ^e crônico; ^f Os casos 3 e 4 são irmãs.

DISCUSSÃO

A substituição c.3299A>C (Q1100P) no éxon20 (Caso1 - homozigoto e o caso 2 - Q1100P/N1303K) foi primeiro descrita em um menino espanhol com FC diagnosticado aos três anos de idade. Essa criança era heterozigótica para a mutação F508del, tinha insuficiência pancreática (IP) e foi colonizada por *Pseudomonas aeruginosa* [8], semelhante ao caso descrito aqui. Essa mutação não possui categorização de classe funcional ainda; no entanto, é considerada como definitivamente patogênica (comunicação pessoal, Mendelics Laboratory)¹. O Caso 2, foi submetido à triagem neonatal, com elevação da IRT, mas o diagnóstico foi feito somente após manifestações clínicas (baixo peso e altura, distúrbios hidroeletrólíticos e hepatite associada à infecção por citomegalovírus), que revela falhas no acompanhamento pós triagem neonatal e reforça a importância de estudos de conscientização pública e políticas públicas de saúde relacionadas à FC no Brasil. A suspeita clínica ainda é baixa entre os pediatras brasileiros, o que leva ao subdiagnóstico.

A substituição c.326A>G (Y109C) no éxon4 (casos 3e 4 - Y109C/G1069R; 5T/12TG), considerada como definitivamente patogênica, foi descrita pela primeira vez em uma criança com genótipo 3659delC/Y109C, suficiência pancreática, recorrente episódios de infecções por *Staphylococcus aureus* e algumas culturas positivas para *P. aeruginosa*, mas sem colonização crônica [9]. Embora a literatura atual aponte para suficiência pancreática em pacientes com essa mutação, as crianças descritas aqui (duas irmãs) têm queixas de esteatorreia, apesar de níveis normais de elastase fecal. É possível que o genótipo apresentado pelas pacientes (associado à presença do alelo 5T) possa contribuir para a ocorrência de PI [10, 11].

A substituição c.319 G>C (A107P) no éxon4 causa a variante p.Ala107Pro (Caso 5 - A107P/L206W) e promove a substituição do aminoácido alanina na posição 107, que é um aminoácido conservado entre diferentes espécies, por prolina (Figura 1). Baseado em ferramentas *in silico* utilizando os algoritmos computacionais *Sort Intolerant From Tolerant* (SIFT) e *Polymorphism Phenotyping2* (PolyPhen2), a variante p.Ala107Pro é prevista como tolerante (escore 0,25) e provavelmente patogênico (escore 1,00) respectivamente [12, 13]. Esta mutação não foi descrita em bancos de dados públicos, como 1000 Genomes, ExAC Browser Beta,

¹ Comunicação pessoal, Mendelics Laboratory. A anotação e previsão de patogenicidade foi realizada pelo laboratório Mendelics, usando o software Abracadabra, bem como consultando o banco de dados de mutações no genoma humano e o banco de dados ClinVar.

NHLBI Exome Sequencing Project [14–16]. Usando a EV mutation [17], uma metodologia que pode ser usada para avaliar os efeitos quantitativos das mutações genéticas em um organismo, a variante A107P apresentou - 82.504 de previsão epistática, - 50.680 de previsão independente, 0.000543323 frequência e 0,2074 de conservação, o que sugere um efeito patogênico dessa variante. Uma variante diferente no códon107 (p.Ala107Val, relatado como A107V) foi descrito na heterozigose com a mutação F508del em um indivíduo com fenótipo de fibrose cística [18]. O caso 5 é um heterozigoto composto (A107P/L206W), com testes do suor positivos e sintomas compatíveis com FC, sugerindo que essa mutação é realmente patogênica. Entre os dez pacientes descritos, esse é o único classificado como suficiente pancreático. A segunda mutação encontrada é relativamente comum em canadenses franceses e é geralmente associado a um fenótipo mais leve [19, 20]. Portanto, não é possível associar a insuficiência pancreática deste paciente com a mutação A107P. Estudos futuros da análise funcional utilizando testes bioquímicos e eletrofisiológicos devem ser desenvolvidos para esclarecer a patogenicidade dessa variante e em qual classe essa mutação deve ser incluída.

```

LLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIIHomosapiens (human)
LLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIPan troglodytes (chimpanzee)
LLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIMacaca mulatta (Rhesus monkey)
LLLGRIIASYDPDNKQERSIAIYLAICanislupus familiaris (dog)
LLLGRIIASYDPDNKVERSIAYLGI Bostaurus (cattle)
VLLGRIIASYDPENKVERSIAYLGI Mus musculus (house mouse)
VLLGRIIASYDPDNTEERSIAIYLGI Rattus norvegicus (Norway rat)
LLLGRIIASYDPDNSSERSIAYLGI Gallus gallus (chicken)
QLLGRIIASFDPAHEPERANGYFLAF Danio rerio (zebrafish)
LLLGRIIASYDRDNEHERSIAYYLAIXenopus tropicalis (frog)

```

Figura 1- Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada A107P localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies

A substituição c.484 A>G (K162E) no exón4 (Caso 6 - K162E / 2307insA) foi relatada apenas em um paciente de origem grega, sem doença pulmonar ou pancreática, com sintomas inconclusivos de teste do suor e heterozigoto composto com F508del[1]. É classificada como uma mutação de significado incerto, mas o aminoácido lisina na posição 162 é conservado em diferentes espécies (Figura 2). Considerando a análise *in silico* utilizando o SIFT, a variante é prevista como tolerante (pontuação 0,42) e no PolyPhen2 como provavelmente patogênica (pontuação 0,999) [12, 13]. O caso 6 apresenta quadro clínico compatível com IP

apesar dos níveis normais de elastase fecal, testes do suor positivos, sugerindo que a mutação K162E é realmente patogênica.

```
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIHomosapiens (human)
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIPantroglodytes (chimpanzee)
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIMacacamulatta (Rhesus monkey)
MQIRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISICanislupus familiaris (dog)
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIBostaurus (cattle)
MQMRTAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIMus musculus (house mouse)
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISIRattus norvegicus (Norway rat)
MQIRIALFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISTGallus gallus (chicken)
MQIRIALFSIIYKKTTLKLSSRVLDKISTDanio rerio (zebrafish)
MQMRIAMFSLIYKKTTLKLSSRVLDKISTXenopus tropicalis (frog)
```

Figura 2- Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada K162E localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies

A substituição c.4225G> A (E1409K) no exón 26 (Caso7 — F508del/E1409K) foi descrita em espanhol paciente com ausência bilateral congênita dos vasos deferentes (CBAVD) e heterozigótico composto com a mutação N1303K [1]. Essa é uma variante de significado incerto, mas o ácido glutâmico na posição 1409 é conservado entre diferentes espécies (Figura 3). Considerando a análise *in silico* utilizando o SIFT, prevê-se que a variante seja tolerante (pontuação 0,11) e no PolyPhen2 é possivelmente patogênica (score 0,859) [12, 13]. O caso 7 possui o genótipo F508del/E1409K, manifestações clínicas compatíveis com CF, incluindo esteatorreia, níveis elevados de cloro no suor, sugerindo que essa mutação é de fato patogênica.

```
VILCEHRIEAMLEECQQFLVIEENKVRHomosapiens (human)
VILCEHRIEAMLEECQQFLVIEENKVRPantroglodytes (chimpanzee)
VILCEHRIEAMLEECQQFLVIEENKVRMacacamulatta (Rhesus monkey)
VILSEHRIEAMLEECQRFLVIEDSRLR Canis lupus familiaris (dog)
VILSEHRIEAMLEECQRFFVIEENKVR Bos taurus (cattle)
VILCEHRIEAMLDCQRFLVIEESNVW Mus musculus (house mouse)
VVLCEHRIEAMLDCQRFLVIEQGNVW Rattus norvegicus (Norway rat)
VVLSEHRLEAILECQRFLVIEDNKMR Gallus gallus (chicken)
ILLSEHKVEPLLEECQSFLMMDKGQVK Danio rerio (zebrafish)
VILSEHRLEAMLEECQHFLVIEDNTVRXenopus tropicalis (frog)
```

Figura 3- Alinhamentos múltiplos demonstrando a variante identificada E1409K localizada em uma região conservada da proteína CFTR em diferentes espécies.

Este estudo também relatou quatro outras mutações descritas apenas uma vez em pacientes brasileiros com FC. A mutação c.3205G>A (G1069R) foi descrita em um paciente heterozigótico com a segunda mutação não identificada [21]; este estudo detectou essa variante em duas irmãs (Y109C/G1069R;5T/12TG), casos 3 e 4, e em um paciente insuficiente pancreático (G1069R; 5T/TG11), com episódios recorrentes de infecções respiratórias e tosse crônica, retardo de crescimento, dificuldade de ganho de peso no diagnóstico e pancreatite recorrente. A mutação c.601G>A (V201M) classificada como de significado incerto já foi relatada em heterozigose em um paciente que não teve a segunda mutação identificada [22]. Neste estudo, um paciente com genótipo G542X/V201M foi diagnosticado por triagem neonatal. A mutação c.1397C>A (S466X) descrita anteriormente em um paciente brasileiro com o genótipo (R1070Q; S466X/G542X) [23], foi encontrado no presente estudo em um caso(S466X/F508del), diagnosticado com FC aos 15 anos devido a infecções respiratórias recorrentes, desnutrição e colonização crônica por cepa mucóide de *P. aeruginosa* e teve confirmação laboratorial de insuficiência pancreática. Apesar do atraso no diagnóstico, colonização pulmonar crônica e duas mutações graves, o paciente tem respondido muito bem ao tratamento(3 anos de acompanhamento): ele tem boa função pulmonar, recuperação nutricional e não apresentou nenhuma exacerbação respiratório durante o acompanhamento. A segunda mutação do Caso 6, c.2175_2176insA (2307insA), foi relatada no REBRAFC, 2014 [24] com frequência alélica de 0,3% (heterozigose em apenas um paciente).

O Brasil é o sétimo país em número de pacientes com FC registrados [25] e apesar da população brasileira ter um elevado grau de miscigenação, constituído de um tri-híbrido (índios, africanos e descendentes europeus) com matriz europeia representando 48% da população [26], a composição étnica é altamente variável nas diferentes regiões geográficas brasileiras, que afeta a frequência de cada mutação do gene *CFTR*. Portanto, é necessário usar um painel de investigação específico para cada região do país [21]. Dados do REBRAFC mostram que a mutação F508del é a mais frequente no Brasil com frequência alélica de 48,7% [5], abaixo da frequência mundial (85%) [25]. Um estudo anterior em nosso centro destacou a importância de pesquisar a mutação F508del, mas também enfatizou a relevância do conhecimento sobre o perfil genético de pacientes com FC em populações

miscigenadas, desde que foram identificadas mutações de diferentes origens étnicas, incluindo as estudadas aqui. Além disso, o desenvolvimento da medicina de precisão, que disponibilizou alguns moduladores CFTR (tratamentos específicos para restaurar a expressão, função e estabilidade da CFTR) resultou em novas perspectivas e avanços no tratamento de pacientes, incluindo aqueles com a mutação F508del [25].

Entre as limitações do presente estudo, pode-se destacar a análise de apenas pacientes pediátricos de um único centro de referência, indisponibilidade de testes funcionais para avaliar o efeito da nova variante *CFTR*, as dificuldades para avaliação da função respiratória em pacientes com menos de 6 anos e as dificuldades de uma investigação mais aprofundada da insuficiência pancreática por impossibilidade da repetição periódica da dosagem de elastase fecal e outros diagnósticos métodos.

Os resultados deste estudo permitiram identificar pacientes com mutações raras e aqueles sem descrição prévia no Brasil (um não ainda descrito na literatura). Esses resultados destacam a alta heterogeneidade genética dessa população. O conhecimento do perfil genotípico de pacientes brasileiros com FC em diferentes regiões geográficas pode contribuir para o desenvolvimento de painéis específicos para investigação genética da FC em cada região do país, tornando esta ferramenta de diagnóstico mais acessível. A primeira descrição da mutação A107P em um paciente com FC destaca a necessidade de relatar o padrão da doença em mutações classificados como de significado incerto, para ajudar a categorizá-las e entender melhor a FC. Informações adicionais sobre a correlação genótipo-fenótipo também foi apresentada, o que pode contribuir para uma maior suspeita clínica da doença que ainda é subdiagnosticada no país, devido a dificuldades no diagnóstico diferencial com outras patologias e na cobertura incompleta da triagem neonatal.

Agradecimentos: Aos pais e pacientes que concordaram em participar deste estudo e ao Grupo Brasileiro de Estudos sobre Fibrose Cística, por disponibilizar o sequenciamento para os pacientes deste centro.

Financiamento: Nosso estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB - PPSUS 020/2013) e Grupo Brasileiro de Estudos sobre Fibrose Cística (GBEFC).

Conformidade com padrões éticos: Nenhum dos autores possui conflito de interesse para divulgar.

Aprovação ética: Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo seres humanos estavam de acordo com os padrões éticos dos procedimentos institucionais e/ou comitê nacional de pesquisa e com a declaração de Helsinque e 1964 e suas alterações posteriores. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário professor Edgard de Santos (protocolo 121/2011). Nós lemos a posição da Revista sobre padrões éticos e afirmamos que este relatório é consistente com as diretrizes do Comitê de Ética em Publicações (COPE).

Consentimento informado: O formulário de consentimento informado foi assinado por cada participante ou seu representante legal.

REFERÊNCIAS

1. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>. Accessed 6 Apr 2018.
2. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat 19(6):575–606.
3. De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. Lancet Respir Med 4(8):662–674.
4. Mota LR, Souza EL, Rocha PHSA, Vieira MJF, dos Santos JF, Lage VMGB et al (2015) Estudos genéticos sobre a fibrose cística no Brasil: uma revisão sistemática. Rev Ciênc Méd Biol 14(2):238–245
5. Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC)—Patient Registry 2015. http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2015_Ingles.pdf.

6. Abe-Sandes K, Bomfim TF, Machado TMB, Abe-Sandes C, Acosta AX, Alves CRB et al (2010) Genomic ancestry, socioeconomic status and vulnerability to HIV/AIDS in Bahia, Brazil. *Saude Soc* 19(2):75–84.
7. Mota LR, de Castro LL, da Anunciação Ferreira T, de Lima RL, Toralles MB, Souza EL (2018) Cystic fibrosis: identification and frequency of mutations in a mixed population from a low-income region in Northeastern Brazil. *Pediatr Pulmonol* 53:1006–1008.
8. Chillón M, Casals T, Gimenez J, Ramos MD, Palacios A, Morral N et al (1994) Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 93:447–451.
9. Schaedel C, Kristoffersson A-C, Kornfalt R, Holmberg L (1994) A novel cystic fibrosis mutation, Y109C, in the first transmembrane domain of CFTR. *Hum Mol Genet* 3:1001–1002.
10. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S et al (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332(22):1475–1480.
11. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 3:151–156.
12. Sort Intolerant From Tolerant—SIFT. <http://sift.jcvi.org/>. Accessed 5 Apr 2018.
13. Polymorphism Phenotyping 2—PolyPhen2. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Accessed 5 Apr 2018.
14. 1000 Genomes Project. <http://www.internationalgenome.org/>. Accessed 5 Apr 2018.
15. ExAC Browser Beta. <http://exac.broadinstitute.org/>. Accessed 5 Apr 2018.
16. NHLBI Exome Sequencing Project. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Accessed 5 Apr 2018.

17. Hopf TA, Ingraham JB, Poelwijk FJ, Schärfe COI, Springer M, Sander C et al (2017) Mutation effects predicted from sequence conservation. *Nat Biotechnol* 35(2):128–139.
18. Rana-Diez P, Colon C, Alonso-Fernandez JR, Solar A, Barros-Tizon JC, Barros-Casas D et al (2008) Three novel mutations in the CFTR gene identified in Galician patients. *J Cyst Fibros* 7:520–522.
19. Rozen R, Ferreira-Rajabi L, Robb L, Colman N (1995) L206W mutation of the cystic fibrosis gene, relatively frequent in French Canadians, is associated with atypical presentations of cystic fibrosis. *Am J Med Genet* 57:437–439.
20. Clain J, Lehmann-Che J, Duguépéroux I, Arous N, Girodon E, Legendre M et al (2005) Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mutat* 25:360–371.
21. Faucz FR, Gimenez J, Ramos MD, Pereira-Ferrari L, Estivill X, Raskin S et al (2007) Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin Genet* 72:218–223.
22. Bernardino ALF, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CEA, Nakaie CMA, Gomes CET, Damaceno N et al (2000) Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test* 4(1):69–74.
23. Furlan LL, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DR, Marson FA (2017) Variants in the interleukin 8 gene and their response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)* 93:639–648.
24. Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC)—Patient Registry 2014. http://portal.igbec.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2014_Ingles.pdf. Accessed 5 Apr 2018.
25. Lopes-Pacheco M (2016) CFTR modulators: shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front Pharmacol* 7:275.
26. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Brazilian census (2010) <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 1 Aug 2018.

CAPÍTULO IV

Pediatrics Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology

Periódico: Pediatrics Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology

Ano de Publicação: 2018

Tipo: relato de caso

APRESENTAÇÃO INCOMUM DE FIBROSE CÍSTICA COMO DERMATITE DIFUSA

Bianca Sampaio Bonfim¹, Laís Ribeiro Mota², Carolina de Godoy Almeida³, Ana Paula de Brito Aguiar⁴, Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima⁵, Ângela Peixoto de Mattos⁶, Edna Lúcia Souza^{1,6}

¹Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia

²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

³Universidade Estadual da Bahia

⁴Maternidade Climério de Oliveira

⁵Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia

⁶Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia

***Correspondente**

Edna Lúcia Souza, Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Avenue Santa Luzia, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brasil.

Email: souza.ednalucia@gmail.com, ednalu@ufba.br

A fibrose cística é uma das doenças autossômicas recessivas mais comuns entre caucasianos. A maioria das manifestações está relacionada à doença pulmonar e deficiência pancreática exócrina. Dermatite grave é uma apresentação rara da doença¹.

Um menino não caucasiano de 5 meses de idade, nascido a termo (peso 3.900g) e sem parentesco entre os pais era saudável e amamentado exclusivamente até os 4 meses de idade, quando desenvolveu uma erupção eritematosa na pele. A criança foi avaliada e diversos diagnósticos foram propostos: dermatite atópica, dermatite de contato e sarna. As lesões foram tratadas com várias formulações tópicas, incluindo corticosteroides, antibióticos e antifúngicos, sem resolução. Depois disso, a erupção foi generalizada e o paciente começou a apresentar tosse e chiado; portanto, antibióticos orais foram prescritos. No entanto, à medida que sua condição geral piorou, ele também desenvolveu edema nos membros inferiores e foi transferido para o Hospital Universitário Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brasil.

Na admissão, o paciente estava com edema generalizado, pápulas eritematosas difusas, sibilante e com descamação na pele envolvendo rosto, tórax, membros e órgãos genitais [Figuras 1 e 2]. O peso corporal e o comprimento foram registrados: 7,090 kg e 62,2 cm, e sua avaliação nutricional mostrou: peso/idade (P/I) Z score = +0,99; altura/idade (A/I) Z-score = -1,75 e peso/altura (P/A) Z-score = -0,52. O exame da mucosa foi normal e nenhuma anormalidade foi encontrada. Exames laboratoriais anormais foram: hemoglobina 9,7 g/dL, albumina 1,8 g/dL, aspartato aminotransferase 116 UI/L, alanina transaminase 60 UI/L, Na⁺ 133 mEq/L. As culturas de sangue, urina e fezes foram negativas. O diagnóstico inicial foi erupção medicamentosa com hipoalbuminemia. No entanto, a fibrose cística foi investigada e apresentou dois testes do suor positivos (cloro 99/98 e 86/85 mEq/L). O valor do esteatócrito foi de 22% e culturas de orofaringe foram isoladas: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi realizado teste genético e as mutações F508del e 3120+1G>A foram identificadas. O nível de elastase-1 fecal foi inferior a 15 µE1/g. Enzimas pancreáticas foram introduzidas, bem como vitaminas, antibióticos e terapia nutricional. O paciente apresentou melhora nas lesões de pele, edema e estado nutricional. Ele recebeu alta em boa condição clínica após 37 dias de internação.



Figura 1 - Paciente com cinco meses apresentando edema generalizado, pápulas eritematosas com descamação difusa e sibilante.



Figura 2- Menino com cinco meses apresentando edema generalizado, sibilos e pápulas eritematosas com descamação envolvendo face, costas e membros.

Atualmente, ele tem 7 anos e está em acompanhamento ambulatorial no mesmo ambulatório multidisciplinar de fibrose cística, com boa nutrição status: P/I Z-score= 0,6; A/I Z-score= -0,1; índice de massa corporal Z-score= +1,38 e parâmetros clínicos estáveis [Figuras 3 e 4].



Figura 3- Recuperação do paciente após algumas semanas de tratamento, mostrando regressão inicial do edema e das lesões na pele.



Figura 4- Paciente após alguns anos de tratamento da fibrose cística com crescimento e estado nutricional adequados

A dermatite grave e generalizada como apresentação inicial é raro e aproximadamente 30 casos foram descritos^{1,2}. Edema, anemia e desnutrição são manifestações clínicas graves de fibrose cística em lactentes. Geralmente ocorre em bebês com idades variando de 2 semanas a 15 meses¹. A erupção cutânea geralmente aparece como pápulas eritematosas que evoluem em semanas à meses para placas extensas com descamação. As lesões são notadas pela primeira vez nas áreas e extremidades das fraldas ou periorais; posteriormente, a dermatite pode se generalizar sem resposta a formulações tópicas, incluindo corticosteroides, antibióticos, antifúngicos ou suplementação oral com zinco¹.

As lesões cutâneas podem ser confundidas com outras doenças, retardando o diagnóstico e tratamento adequado. Diagnóstico diferencial deste tipo de erupção cutânea sem manifestações sistêmicas são associadas à dermatite atópica, psoríase, dermatite seborreica, histiocitose das células de Langerhan, síndromes de imunodeficiência e acrodermatite enteropática. Kwashiorkor e a deficiência de ácidos graxos essenciais devem ser incluídos no diagnóstico diferencial, principalmente se houver outras características clínicas presentes.^{1,3} Este paciente foi previamente diagnosticado com dermatite atópica, dermatite de contato e sarna. Sintomas gastrointestinais, pulmonares e edema, geralmente ocorrem 1-2 meses após o início da erupção cutânea; esses sintomas também foram observados no caso descrito. Anormalidades laboratoriais incluem hipoproteinemia, hipoalbuminemia, anemia, colesterol baixo, deficiência de zinco, vitaminas lipossolúveis indetectáveis, esteatorreia, transaminases e fosfatase alcalina elevadas^{1,2,4}. A maioria destas anormalidades foram observadas em nosso paciente.

A etiopatogenia das alterações cutâneas na fibrose cística ainda permanece desconhecida, mas aparentemente está relacionada a deficiências concomitantes de proteínas, zinco, ácidos graxos essenciais e possivelmente cobre³⁻⁵. A deficiência de ácidos graxos essenciais ocorre mesmo em pacientes que têm suficiência pancreática⁴. Além disso, as crianças são mais suscetíveis à deficiência de ácidos graxos essenciais devido a altas demandas metabólicas².

Essa apresentação clínica atípica da fibrose cística pode ser confundida com dermatite de diferentes etiologias e a presença de edema e de deficiência de proteínas, podem causar falsa negatividade no teste do suor, que pode contribuir

para o atraso do diagnóstico^{2,3}. Além disso, não há achados histopatológicos patognomônicos dessa erupção cutânea, e aspecto microscópico da lesão é comum a várias doenças como dermatite eczematosa, dermatite seborreica e reações medicamentosas¹. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado da fibrose cística são cruciais para esta apresentação clínica, uma vez que está associada a um mau prognóstico e as lesões podem evoluir com infecção secundária e septicemia, cujas sequelas podem ser graves e progredir para morte^{1,3}. No entanto, a erupção cutânea geralmente melhora após 2 semanas de terapia nutricional e reposição enzimática pancreática, como nestecaso¹.

Declaração de consentimento do paciente: Os autores certificam que obtiveram todos os formulários apropriados de consentimento do pacientes. No formulário, o responsável legal deu seu consentimento de imagens e outras informações clínicas relatadas no trabalho. O tutor entende que nomes e iniciais não serão publicado e serão feitos os devidos esforços para ocultar a identidade do paciente, mas o anonimato não pode ser garantido.

Apoio financeiro: Este trabalho foi parcialmente apoiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) PPSUS 020/2013.

Conflitos de interesse: Não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Lovett A, Kokta V, Maari C. Diffuse dermatitis: An unexpected initial presentation of cystic fibrosis. J Am Acad Dermatol 2008;58:S 1-4.
2. O'Regan GM, Canny G, Irvine AD. 'Peeling paint' dermatitis as a presenting sign of cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2006;5:257-9.
3. Bernstein ML, McCusker MM, Grant-Kels JM. Cutaneous manifestations of cystic fibrosis. Pediatr Dermatol 2008;25:150-7.
4. Darmstadt GL, McGuire J, Ziboh VA. Malnutrition-associated rash of cystic fibrosis. Pediatr Dermatol 2000;17:337-47.

5. Muñiz AE, Bartle S, Foster R. Edema, anemia, hypoproteinemia, and acrodermatitis enteropathica: An uncommon initial presentation of cystic fibrosis. *Pediatr Emerg Care* 2004;20:112-4.

CAPÍTULO V

Pediatrics Pulmonology

Periódico: Pediatrics Pulmonology

Ano de Publicação: 2018

Tipo: Carta ao editor

**FIBROSE CÍSTICA: IDENTIFICAÇÃO E FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES EM UMA
POPULAÇÃO MISCIGENADA DE UMA REGIÃO DE BAIXA RENDA DO
NORDESTE DO BRASIL**

**Laís R. Mota¹, Lorena L. de Castro², Tatiane da Anunciação
Ferreira³, Renata Lúcia L. F. de Lima⁴, Maria Betânia P. Toralles²,
Edna Lúcia Souza^{2,3*}**

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

² Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia

³ Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia

***Correspondente**

Edna Lúcia Souza, Department of Pediatrics, School of Medicine of
Bahia, Federal University of Bahia, Avenue Santa Luzia, 379/902,
Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brasil.

Email: souza.ednalucia@gmail.com, ednalu@ufba.br

As evidências atuais apontam para a importância de uma abordagem mais personalizada que leve em consideração a etnia/raça de uma população no diagnóstico de fibrose cística (FC). Estudos recentes indicaram que o uso do sequenciamento genético é uma abordagem confiável para diagnosticar a FC. Embora essa abordagem seja extremamente relevante, é cara. O uso racional de recursos em saúde é altamente recomendado, especialmente em áreas de baixa renda. O Brasil é um país de dimensões continentais e com grande heterogeneidade étnico-racial. O estado da Bahia, localizado no nordeste do Brasil, apresenta uma população com alto grau de miscigenação devido às características de sua ancestralidade: africana (47,3%), europeia (36,4%) e ameríndia (16,3%)¹. A população desse estado é de aproximadamente 15,2 milhões, a maioria com baixa renda, e apenas dois centros médicos prestam atendimento clínico a pacientes com FC; esses centros fazem parte do sistema público de saúde, que possui cobertura global neste país ².

Nosso centro é uma clínica multidisciplinar, localizada no Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia. Desde janeiro de 2008, registramos e acompanhamos prospectivamente pacientes com FC de 0 aos 20 anos de idade. Entre 2012 e 2017, 50 pacientes com diagnóstico confirmado de FC por dois testes positivos do suor foram submetidos à análise molecular para rastreamento de sete mutações por métodos convencionais, utilizando amostras de sangue periférico (reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática) ou por sequenciamento de última geração de amostras de mucosa utilizando a plataforma Illumina HiSeq sempre que não foi possível determinar o genótipo dos pacientes através de análises convencionais.

Dos pacientes estudados, 26 (52%) eram do sexo masculino, 48 (96%) não eram brancos, com média de idade de 6 anos. Por meio de técnicas moleculares convencionais, cinco mutações foram identificadas, permitindo determinar o genótipo de 25 pacientes. O estudo de sequenciamento identificou 14 novas mutações (incluindo uma nova variante, ainda não descrita na literatura), expandindo para 43 (86%) o número de pacientes com genótipo conhecido. Esses achados nos permitiram prever que, usando um painel de 20 mutações, poderíamos concluir a

genotipagem diagnóstica de aproximadamente 90% de nossos pacientes. Três pacientes não tiveram alelo mutante identificado e quatro pacientes adicionais apresentaram apenas uma mutação. Os genótipos e as frequências de mutação estão descritos na Tabela 1 e 2.

Tabela 3-Genótipos de pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.

Genótipo	Frequência	Medicina de Precisão
F508del/F508del	14 (28%)	Sim ^{a,c}
F508del/3120+1G>A	7 (14%)	Não
F508del/G542X	3 (6%)	Não
F508del/D1152H	1 (2%)	Sim ^{b,c}
F508del/S466X	1 (2%)	Não
F508del/3272-26A>G	1 (2%)	Sim ^{b,c}
F508del/E1409K	1 (2%)	Não
F508del/W1282X	1 (2%)	Não
F508del; 11TG/5T	1 (2%)	Não
F508del /Unknown	2 (4%)	-
G542X/G542X	1 (2%)	Não
G542X/R1162X	1 (2%)	Não
G542X/R334W	1 (2%)	Não
G542X/V201M	1 (2%)	Não
R1162X/R1162X	1 (2%)	Não
R334W/R334W	1 (2%)	Não
Q1100P/Q1100P	1 (2%)	Não
Q1100P/N1303K	1 (2%)	Sim ^b
G1069R/Y109C; 5T/12TG	2 (4%)	Sim ^b
G1069R; TG11/5T	1 (2%)	Sim ^{b,c}
L206W/A107P	1 (2%)	Não
2307insA/K162E	1 (2%)	Não
Heterozigoto 5T	1 (2%)	Não
11TG/7T e 11TG/5T	1 (2%)	Não
Unknown/Unknown	3 (6%)	-

* Baseado no Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) 2015. ^aElegível para combinação Lumacaftor/Ivacaftor. ^bElegível para Ivacaftor. ^cElegível para combinação Tezacaftor/Ivacaftor.

Tabela 4 - Frequência das mutações encontradas em pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.

Alelos	Classe Mutação	Frequência	Brasil*
F508del	II	46/100 (46%)	48.7%
3120+1G>A	I	7/100 (7%)	1.1%
G542X	I	8/100 (4.3%)	4.3%
R1162X	I	3/100 (3%)	1.1%
R334W	IV	3/100 (3%)	1.2%
D1152H	IV	1/100 (1%)	0.2%
S466X	I	1/100 (1%)	-
3272-26A>G	I	1/100 (1%)	0.1%
E1409K	-	1/100 (1%)	-
V201M	-	1/100 (1%)	-
Q1100P	-	3/100 (3%)	-
N1303K	II	1/100 (1%)	0.9%
G1069R	-	3/100 (3%)	-
Y109C	-	2/100 (2%)	-
L206W	II	1/100 (1%)	0.1%
A107P	-	1/100 (1%)	-
2307insA	I	1/100 (1%)	0.03%
K162E	-	1/100 (1%)	-
W1282X	I	1/100 (1%)	0,4%
Alelo 5T	-	4/100 (4%)	-
Not identified	-	9/100 (9%)	-

* Oito pacientes eram relacionados

Os avanços na medicina de precisão requerem conhecimento dos perfis genotípicos dos pacientes com FC. No entanto, o desempenho rotineiro dos testes genéticos não é uma realidade para a grande maioria dos centros de atenção em FC no Brasil. Dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) de 2015 indicou que apenas 46,2% dos 3.857 pacientes foram submetidos a algum estudo genético³. Assim, é necessária uma expansão no uso de testes genéticos para melhor diagnosticar a FC. Para otimizar o diagnóstico sem aumentar significativamente o custo, prevemos que o desenvolvimento de um painel de mutações mais específicas para cada região é altamente recomendado, pois o uso de um único painel pode não ser igualmente sensível, principalmente em regiões com grande heterogeneidade de etnia/raça como o Brasil.

Os resultados de nosso estudo revelaram que, apesar do alto grau de miscigenação da população estudada, com 96% dos pacientes não brancos, a

investigação inicial de apenas a mutação F508del determinou o genótipo de aproximadamente 30% dos pacientes. Esse achado corrobora com a proposta de uma investigação inicial que busca apenas a mutação F508del, como sugerido para pacientes do sudeste brasileiro ⁴. Em nossa população, a investigação subsequente das mutações G542X e 3120+1G>A expandiu o conhecimento do genótipo para 50% dos pacientes. Assim, o estabelecimento de um protocolo passo a passo, com a pesquisa de apenas três mutações, pode otimizar o uso de recursos de saúde pública e aumentar o acesso às técnicas de diagnóstico molecular. As outras mutações, encontradas apenas por sequenciamento, podem ser incorporadas a um painel específico para essa região do Brasil, reservado apenas para pacientes cujo genótipo não pôde ser determinado pela investigação inicial.

A identificação dos genótipos de nossos pacientes nos permitiu descobrir que 42% deles eram elegíveis para tratamento medicamentoso de precisão: 14 (28%) pacientes F508del/F508del - Lumacaftor/Ivacaftor ou combinação Tezacaftor/Ivacaftor; 3 (6%) pacientes eram adequados para usar Ivacaftor e 3 (6%) pacientes para uso da associação Tezacaftor/Ivacaftor ou Ivacaftor ⁵. Além disso, devido à baixa disponibilidade de outros recursos de diagnóstico, como avaliação da função CFTR ou dosagem periódica de elastase fecal para investigar a insuficiência pancreática, a determinação do genótipo contribuiu firmemente para melhorar as estratégias de tratamento para nossos pacientes.

Apoio financeiro: Este estudo foi parcialmente apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB- Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Bahia) e pelo Registro Brasileiro de Fibrose Cística (RBFC - Registro Brasileiro de Fibrose Cística).

Conflito de interesse: Nenhum dos autores tem nenhum conflito de interesse a divulgar.

REFERÊNCIAS

- 1- Abe-Sandes K, Bomfim TF, Machado TMB, Abe-Sandes C, Acosta AX, Alves CRB, et al. Genomic Ancestry, socioeconomic status and vulnerability to HIV/AIDS in Bahia, Brazil. *Saude Soc* 2010;19(2): 75-84.
- 2- IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Characteristics of the population and domiciles of Census 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acess: jan/28/2018.
- 3- Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC) – patient registry 2014 (online). http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2014_Ingles.pdf. Acesso: 05/02/2018.
- 4- Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro MÂ, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*. 2013; 39(3):306-16.
- 5- Kirby T. Tezacaftor–ivacaftor is safe and efficacious in patients with cystic fibrosis with Phe508del mutations. *Lancet Respir Med*. 2018; 6(1):13-14.

Dados Preliminares Artigo 6

Principais dados clínicos:

- ✓ Grupo amostral: 57 pacientes
- ✓ Idade atual: mediana 6,7 anos (4 meses - 20,5 anos);
- ✓ Idade no diagnóstico: mediana 7 meses (1 mês - 15,8 anos);
- ✓ Três aram brancos;
- ✓ Sexo: 29 (50,9%) meninos
- ✓ Pacientes relacionados: oito
- ✓ 42 (70,1%) elegíveis para medicina de precisão
- ✓ MLPA: Três pacientes negativos

Resultados preliminares:

Genótipos de pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.

Genótipo	Frequência	Medicina de Precisão
F508del/F508del	18 (31,6%)	LUMA/IVA ou TEZA/IVA
F508del/3120+1G>A	8 (14%)	TRIKAFTA
F508del/G542X	3 (5,3%)	TRIKAFTA
F508del/D1152H	1 (1,7%)	TRIKAFTA ou IVA ou TEZA/IVA
F508del/S466X	1 (1,7%)	TRIKAFTA
F508del/3272-26A>G	1 (1,7%)	TRIKAFTA ou IVA ou TEZA/IVA
F508del/E1409K	1 (1,7%)	TRIKAFTA
F508del; 11TG/5T	1 (1,7%)	TRIKAFTA
F508del/W1282X	1 (1,7%)	TRIKAFTA
F508del /Unknown	2 (3,5%)	TRIKAFTA
F508del/1717-1G>A	1 (1,7%)	TRIKAFTA
G542X/G542X	1 (1,7%)	Não
G542X/R1162X	1 (1,7%)	Não
G542X/R334W	1 (1,7%)	Não
G542X/V201M	1 (1,7%)	Não
R1162X/R1162X	1 (1,7%)	Não
R334W/R334W	1 (1,7%)	Não
R334W/3120+1G>A	1 (1,7%)	Não
R334W/K162E	1 (1,7%)	Não
Q1100P/Q1100P	1 (1,7%)	Não
Q1100P/N1303K	1 (1,7%)	Não
G1069R/Y109C;5T/12TG	2 (3,5%)	IVACAFTOR
G1069R;TG11/5T	1 (1,7%)	IVACAFTOR
L206W/A107P	1 (1,7%)	IVA ou TEZA/IVA
2307insA/K162E	1 (1,7%)	Não
541delC/K162E	1 (1,7%)	Não
P205S/P205S	1 (1,7%)	Não
Heterozigoto 5T	1 (1,7%)	Não
Unknown/Unknown	1 (1,7%)	-

*Três pacientes foram a óbito

Frequência das mutações encontradas em pacientes com fibrose cística em um centro de referência na Bahia, Brasil.

Alelos	Classe Mutacional	Frequência	Brasil*
F508del	II	56/114 (49,1%)	48.7%
3120+1G>A	I	9/114(7,9%)	1.1%
G542X	I	8/114(7%)	4.3%
R1162X	I	3/114 (2,6%)	1.1%
R334W	IV	5/114(4,4%)	1.2%
D1152H	IV	1/114(0,9%)	0.2%
S466X	I	1/114(0,9%)	-
3272-26A>G	V	1/114(0,9%)	0.1%
E1409K	-	1/114(0,9%)	-
V201M	-	1/114(0,9%)	-
Q1100P	-	3/114 (2,6%)	-
N1303K	II	1/114(0,9%)	0.9%
G1069R	-	3/114 (2,6%)	-
Y109C	-	2/114 (1,7%)	-
L206W	II	1/114(0,9%)	0.1%
A107P	-	1/114(0,9%)	-
2307insA	I	1/114(0,9%)	0.03%
K162E	-	3/114 (2,6%)	-
W1282X	I	1/114(0,9%)	0.4%
541delC	I	1/114(0,9%)	
1717-1G>A	I	1/114(0,9%)	
P205S	IV	2/114 (1,7%)	
Alelo 5T	-	5/114 (4,4%)	-
Not identified	-	5/114 (4,4%)	-

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados de nosso estudo revelaram que:

✓ Foram encontradas 22 diferentes variantes no gene *CFTR* (incluindo o polimorfismo 5T) de diferentes origens étnico/raciais. Esses achados confirmam o elevado grau de miscigenação da população estudada, quando comparada a populações de predomínio europeu;

✓ Apesar do elevado grau de miscigenação da população estudada, com 94,7% dos pacientes não brancos, a mutação F508del foi a mais encontrada, com 49,1% de frequência alélica;

✓ A investigação inicial apenas da mutação F508del foi capaz de determinar o genótipo de mais de 30% dos pacientes. Esse achado corrobora com a proposta de uma investigação inicial que busca apenas a mutação F508del, como sugerido para pacientes do sudeste brasileiro, racionando assim os recursos da saúde pública;

✓ Na população estudada, a investigação subsequente das mutações G542X e 3120+1G→A, R1162X e R334W expandiu o conhecimento do genótipo para 61,4% dos pacientes. Assim, o estabelecimento de um protocolo racional, com a pesquisa de apenas cinco mutações, pode otimizar o uso de recursos de saúde pública e aumentar o acesso às técnicas de diagnóstico molecular;

✓ Desta forma, nossa sugestão de um protocolo molecular para pesquisa de mutações nesta população é (em pacientes com teste do suor positivo ou duvidoso): primeiro a pesquisa da mutação F508del, seguida pela pesquisa das mutações G542X, 3120+1G→A, R1162X e R334W. Pacientes que ainda permanecerem com genótipo não elucidado, devem ter o gene *CFTR* sequenciado;

✓ Os resultados deste estudo permitiram identificar pacientes com mutações raras e/ou sem descrição prévia no Brasil (um não ainda descrito na literatura). Esses resultados destacam a alta heterogeneidade genética dessa população, quando comparada a populações de predominância europeia;

✓ A primeira descrição da mutação A107P em um paciente com FC destaca a necessidade de relatar o padrão da doença em mutações classificadas como de significado incerto, para ajudar a categorizá-las e entender melhor a FC;

✓ Após o conhecimento do perfil genotípico nesta população, 70,1% dos pacientes foram classificados como elegíveis aos moduladores CFTR, sendo que um destes já está em uso da medicação Kalydeco e apresenta boa evolução do quadro clínico;

✓ O relato de um caso de apresentação clínica rara da FC foi importante para alertar os profissionais, não só os que lidam com a FC, mas também para os dermatologistas e pediatras, visto que essa expressão atípica pode ser confundida com outras doenças e contribuir para o atraso do diagnóstico, particularmente, em pacientes não submetidos à triagem neonatal.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Entre as limitações do presente estudo, pode-se destacar análise de apenas pacientes pediátricos de um único centro de referência; indisponibilidade de testes funcionais para avaliar o efeito da nova variante *CFTR*; as dificuldades para avaliação da função respiratória em pacientes com menos de 6 anos; as dificuldades de uma investigação mais aprofundada da IP pancreática por impossibilidade da repetição periódica da dosagem de elastase fecal e outros diagnósticos métodos; a impossibilidade de realização de broncoscopia em crianças menores para obtenção de melhor amostra do trato respiratório; a impossibilidade de realização do estudo de ancestralidade, para melhor caracterização dos grupos étnicos.

REFERÊNCIAS

. "1000 Genomes Project " Retrieved Disponível em: <http://www.internationalgenome.org/>. Accessed 5 Apr 2018.

"CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION."2019. Disponível em: <www.cff.org>. Acesso em: 04 out. 2019.

Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>. Accessed 6 Apr 2018.

CFTR2. Disponível: <https://www.cftr2.org>. Acesso: 17/10/19

. "ExAC Browser Beta." Retrieved Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org>. Accessed 5Apr 2018.

. "NHLBI Exome Sequencing Project." Retrieved Disponível em: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Accessed 5 Apr 2018.

ABE-SANDES, K., et al. "Genomic Ancestry, Socioeconomic Status and Vulnerability to HIV/AIDS in Bahia, Brazil." **Saúde e Sociedade** 19: 75-84.2010.

ACCURSO, F. "Update in Cystic Fibrosis 2006." **American journal of respiratory and critical care medicine** 175: 754-757.2007.

AUGARTEN A, BEN TOV A, MADGAR I, et al. The changing face of the exocrine pancreas in cystic fibrosis: the correlation between pancreatic status, pancreatitis and cystic fibrosis genotype. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2008;20(3):164–168

ACCURSO FJ. Update in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**. 173: 944-947. 2006

ACCURSO, F.J.; SONTAG, M.K. Gene modifiers in cystic fibrosis. **J Clin Invest**. 2008 Mar;118(3):839-41.

AUDREZET, M-P.; DABRICOT, A.; LE MARECHAL, C.; et al. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**. 2008. v. 10, n.5, p.424-434.

ALEXANDER, S. and BRIDGES, N. "Cystic fibrosis related diabetes." **Practical Diabetes International** 27(5): 198-200.2010.

ALVAREZ, A. E. (2002). **Análise clínica e laboratorial de 104 pacientes, com Fibrose Cística, do ambulatório de pediatria da Unicamp, na última década do século XX, com o genótipo e a gravidade da doença**. 147 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

ALVAREZ, A. E., et al. "Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença." **Jornal de Pediatria** 80: 371-379.2004.

ANDERSEN DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child** 1938; 56: 341-99.

ARIS RM, RENNER JB, WINDERS AD, et al. Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. **Ann Int Med** 1998; 128:186-93.

ARON, Y., et al. "HLA Class II Polymorphism in Cystic Fibrosis." **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 159(5): 1464-1468.1999.

ATHANAZIO, R. A., et al. "Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis." **J Bras Pneumol** 43(3): 219-245.2017.

BALINSKY, W.; ZHU, C.W.; Pediatric cystic fibrosis: evaluating cost and genetic testing. **Journal Pediatric Health Care**. 2004. v. 18, n.1, p.30-34.

BARTH, L. R. (2005). **PERFIL MICROBIOLÓGICO E INDICADORES DE GRAVIDADE EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA**. Tese (Doutorado) Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP: p. 282.

BERNARDINO, A., et al. "Molecular Analysis in Brazilian Cystic Fibrosis Patients Reveals Five Novel Mutations." **Genetic Testing** 4(1): 69-74.2000.

BERNSTEIN, M., et al. "Cutaneous manifestations of cystic fibrosis." **Pediatr Dermatol** 25: 150-157 2008.

BEDROSSIAN CW, GREENBERG SD, SINGER DB, HANSEN JJ, ROSENBERG HS. The lung in cystic fibrosis: a quantitative study including prevalence of pathological finding among different age groups. **Hum Pathol** 1976;7(2):195-204.

BIEGER, A. M., et al. "Prevalence of DeltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center." **J Pediatr (Rio J)** 88(6): 531-534.2012.

BLACKMAN SM, DEERING-BROSE R, MCWILLIAMS R, et al. Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis. **Gastroenterology** 2006;131(4): 1030–1039

BOBADILLA, J. L., et al. "Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening." **Hum Mutat** 19(6): 575-606.2002.

BONADIA, L. C. (2011). **CORRELAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES E FISIOLÓGICOS DE PACIENTES ADULTOS COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE FIBROSE CÍSTICA DE UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO BRASIL.** Tese (Doutorado) Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas-SP.

BORGO, G., et al. "Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis." **Journal of medical genetics** 27(11): 665-669.1990.

BRASIL (2001). **MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria SAS/MS nº 822 de 06 de junho de 2001. Brasília.** Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/PT-338.htm>>. Acesso em 11 jun. 2019.

CABELLO, G. M. K., et al. "The 3120+1GA Splicing Mutation in CFTR Is Common in Brazilian Cystic Fibrosis Patients." **Human Biology** 73(3): 403-409.2001.

CABELLO, G. M. K., et al. "Cystic Fibrosis: Low Frequency of DF508 Mutation in 2 Population Samples from Rio de Janeiro, Brazil." **Human Biology** 71(2): 189-196.1999.

CASTELLANI, C., et al. "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice." **J Cyst Fibros** 7(3): 179-196.2008.

CYSTIC Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponível em: <<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>>. Acesso em: 05 Nov. 2019.

CHILLON, M., et al. "Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes." (0340-6717 (Print))

CHILLON, M., et al. "Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens." (0028-4793 (Print))

CUTTING GR, KASCH LM, ROSENSTEIN BJ, ZIELENSKI J, TSUI LC, ANTONARAKIS SE, KAZAZIAN HH Jr. 1990a. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. **Nature** 346:312–313.

CHU, C.-S., et al. "Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA." **Nature Genetics** 3(2): 151-156.1993.

CLAIN, J., et al. "Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype." **Human Mutation** 25(4): 360-371.2005.

COLLACO, J. M. and Cutting, G. R. "Update on gene modifiers in cystic fibrosis." **Current opinion in pulmonary medicine** 14(6): 559-566.2008.

COLLEN, H. R. (1991). **Cystic Fibrosis**. In Wilson JD et al eds. **Harrison's Principles of Internal Medicine**: 1072-1074.

C. COLOMBO, M.G. APOSTOLO, M. FERRARI, M. SEIA, S. GENONI, A. GIUNTA, et al. Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis **J Pediatr** (Rio J), 124 (1994), pp. 393-939.

CONWAY, S., et al. "Enteral tube feeding for cystic fibrosis." **Cochrane Database of Systematic Reviews**(3).1999.

CORREIA, C. A. D. A. (2005). **PREVALÊNCIA DE SEIS MUTAÇÕES NO GENE CFTR EM PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA DA REGIÃO DE CAMPINAS**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

COUTINHO, C. A. D. A. C., et al. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations at a referral center for cystic fibrosis." **Jornal Brasileiro de Pneumologia** 39: 555-561.2013.

CREMONESI L, FERRARI M, BELLONI E, MAGNANI C, SEIA M, RONCHETTO P, RADYM, RUSSO MP, ROMEO G, DEVOTO M. 1992. Four new mutations of the CFTR gene (541delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes. **Hum Mutat** 1:314-319.

CROSSLEY JR, ELLIOTT RB, SMITH PA. Dried-blood spot screening for Cystic Fibrosis in the newborn. **Lancet** 1979;1(8114):472-4.

CUTTING, G. R. "Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis." **Annals of the New York Academy of Sciences** 1214: 57-69.2010.

CUTTING, G. R. "Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application." **Nat Rev Genet** 16(1): 45-56.2015.

CUTTING GR. Modifier Genetics: Cystic Fibrosis. **Annu Rev Genomics Hum Genet**. 2005; 6:237- 60.

DARMSTADT, G. L., et al. "Malnutrition-Associated Rash of CysticFibrosis." **Pediatric Dermatology** 17(5): 337-347.2000.

DAVIES, J., et al. "Cystic fibrosis modifier genes." **Journal of the Royal Society of Medicine** 98 Suppl 45(Suppl 45): 47-54.2005.

DAVIS, P. B. "Cystic Fibrosis Since 1938." **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 173(5): 475-482.2006.

DAWSON, K. AND FROSSARD, P. "The geographic distribution of cystic fibrosis mutations gives clues about population origins." **European journal of pediatrics** 159: 496-499.2000.

DE BOECK, K. and AMARAL, M. D. "Progress in therapies for cystic fibrosis." **The Lancet Respiratory Medicine** 4(8): 662-674.2016.

DE BOECK, K., et al. "Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms." **Thorax** 61(7): 627-635.2006.

DE LUCA, G.R.; MENEZES, M.A.; OCAMPOS, M. Genética e diagnóstico molecular. IN: LUDWIG NETO, N. **Fibrose Cística: enfoque multidisciplinar**. Florianópolis. Secretaria de Estado de Saúde de Santa Catarina. 2008. p.77-92.

DEMSEY, S. A. "Carrier screening for cystic fibrosis: a perinatal perspective." **Journal of Perinatal & Neonatal Nursing**(0893-2190 (Print)).1999.

DI SANT'AGNESE, P. A.; Darling, R. C.; Perera, G. A., and Shea, E.: Abnormal Electrolyte Composition of Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas: Clinical Significance and Relationship to the Disease, *Pediatrics* 12:549, 1953.

DÖRING G, CONWAY SP. Osteoporosis in cystic fibrosis. **J. Pediatr.** 2008; 84(1): 1-3.

DOMINIC KEATING, M.D., GAUTHAM MARIGOWDA, M.D., LUCY BURR, PH.D., CORI DAINES, M.D., MARCUS A. MALL, M.D., EDWARD F. MCKONE, M.D., et al. VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. **The new england journal of medicine**. October 18, 2018.

DÖRK, T., et al. "A HinfI polymorphism in the cystic fibrosis gene CFTR." **Nucleic acids research** 19(9): 2517-2517.1991.

DURNO C, COREY M, ZIELENSKI J, TULLIS E, TSUI L-C, DURIE P. Genotype and phenotype correlations in patients with cystic fibrosis and pancreatitis. **Gastroenterology** 2002;123(6):1857–1864

EFRATI O, NIR J, FRASER D, COHEN-CYMBERKNOH M, SHOSEYOV D, VILOZNI D, et al. Meconium Ileus in Patients With Cystic Fibrosis Is Not a Risk Factor for Clinical Deterioration and Survival: The Israeli Multicenter Study. **Journal of Pediatric Gastroenterology e Nutrition** 2010; 50(2): 173–78.

ELBORN, J. S. AND BELL, S. C. "Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis and bronchiectasis." **Thorax** 62(4): 288-290.2007.

ELBORN, J.S.; SHALE, D.J.; BRITTON, J.R. Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. **Thorax**. London. 1991. v. 46, n.12, p.881-885.

EMERY AND RIMOIN'S. Principles and Practice of Medical Genetics. **Churchill Livingstone**. Fourth Edition. 2002.

FARBER S, SHWACHMAN H, MADDOCK CL. Pancreatic function and disease in early life. I. Enzyme activity and the celiac syndrome. **J Clin Invest** 1943; 22(6):827-38.

FARRELL, P. M., et al. "Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report." **J Pediatr** 153(2): S4-S14.2008.

FARRELL, P. M., et al. "Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation." **J Pediatr** 181S: S4-S15 e11.2017.

FAUCZ, F. R., et al. "Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles." **Clin Genet** 72(3): 218-223.2007.

FAUCZ FR, SOUZA DA, OLANDOSKI M, RASKIN S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. **J Hum Genet**. 2010;55(2):71-6.

FIATES, G. M. R., et al. "Estado nutricional e ingestão alimentar de pessoas com fibrose cística." **Revista de Nutrição** 14: 95-101.2001.

FITZSIMMONS, S. C. "The changing epidemiology of cystic fibrosis." **The Journal of Pediatrics** 122(1): 1-9.1993.

FRIEDRICH, D. C. "Análise molecular de mutações freqüentes em pacientes com suspeita clínica de Fibrose Cística." **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**.2007.

FRIEDMAN SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **N Eng J Med** 1993;328:1828-35.

FURLAN, L. L., et al. "Variants in the interleukin 8 gene and the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis." **J Pediatr (Rio J)** 93(6): 639-648.2017.

GASKIN KJ, DURIE P, LEE L, HILL R, FORSTNER GG. Colipase and lipase secretion in childhood-onset pancreatic insufficiency. Delineation of patients with steatorrhea secondary to relative colipase deficiency. **Gastroenterology** 1984;86(1):1-7

GIBSON, L. AND COOKE, R. E. "A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis." (0031-4005 (Print)).1959.

GILLJAM, M., et al. "Pregnancy in Cystic Fibrosis: Fetal and Maternal Outcome." **CHEST** 118(1): 85-91.2000.

GEBOREK A, HJELTE L. Association between genotype and pulmonary phenotype in cystic fibrosis patients with severe mutations. **J Cyst Fibros** 2011;10(3):187–192

GRASEMANN, H. "Disease modifier genes in cystic fibrosis." **European Respiratory Monograph** 35: 50.2006.

GUGGINO, W. B. and STANTON, B. A. "New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR." (1471-0072 (Print)).2006.

HAARDT, M., et al. "C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis: A NOVEL CLASS OF MUTATION." **Journal of Biological Chemistry** 274(31): 21873-21877.1999.

HEHR, U., et al. "Silver-Russell syndrome and cystic fibrosis associated with maternal uniparental disomy 7." (0148-7299 (Print))

HOLGUIN, F. "Triple CFTR Modulator Therapy for Cystic Fibrosis." **New England Journal of Medicine** 379(17): 1671-1672.2018.

HONÓRIO, L. F. O. L. N., N.; BARBOSA, E.; et al. . "Avaliação da triagem neonatal para fibrose cística no Estado de Santa Catarina" **Jornal Brasileiro De Pneumologia - J BRAS PNEUMOL**(32): 1-16.2006.

HOPF, T. A., et al. "Mutation effects predicted from sequence co-variation." **Nature Biotechnology** 35: 128.2017.

HOULSTON, R. S. AND TOMLINSON, I. P. M. "Modifier genes in humans: strategies for identification." **European Journal of Human Genetics** 6(1): 80-88.1998.

HODSON, M. E. Thematic Review series: Treatment of cystic fibrosis in the adult. **Respiration**. 2000. v. 67, p.95-607.

HOUSTON, R.S.; TOMLINSON, I.P.M. Modifier genes in humans: strategies for identification. **European Journal of Human Genetics**. London. 1998. v. 6. p.80-88.

HUBERT, D., et al. "Results of assisted reproductive technique in men with cystic fibrosis." **Human Reproduction** 21(5): 1232-1236.2006.

HULL, J. AND THOMSON, A. H. "Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis." **Thorax** 53(12): 1018-1021.1998.

IBGE (2010). (**Brazilian Institute of Geography and Statistics**). **Characteristics of the population and domiciles of Census 2010**. Disponível em : www.ibge.gov.br. Acess: jan/28/2018.

IBGE (2010). **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). **Brazilian census (2010)** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 1 Aug 2018

JAVIER, R.-M. and JACQUOT, J. "Bone disease in cystic fibrosis: What's new?" **Joint Bone Spine** 78(5): 445-450.2011.

JOHANSEN HK, NIRM, HOIBY N, KOCH C, SCHWARTZ M. 1991. Severity of cysticfibrosis in patients homozygous and heterozygous for DF508 mutation.**Lancet** 337:631–634.

KAPLAN, E., et al. "Reproductive failure in males with cystic fibrosis." (0028-4793 (Print)).1968.

KEREM, B.-S., et al. "Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene " **Proc. Nati. Acad. Medical Sciences** 87: 8447-8451.1990.

KEREM, B., et al. "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." (0036-8075 (Print)).1989.

Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** 1996;22(6):387–395

Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui LC, Levison H. 1989c. Clinicaland genetic comparison of patients with cystic fibrosis, with or withoutmeconium ileus. **J Pediatr** 114:767–773.

KIRBY, T. "Tezacaftor–ivacaftor is safe and efficacious in patients with cystic fibrosis with Phe508del mutations." **Lancet Respir Med** 6(1): p.13-14 2018.

KNOWLES, M. R. and DURIE, P. R. "What Is Cystic Fibrosis?" **New England Journal of Medicine** 347(6): 439-442.2002.

Ko, Y., et al. "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: Overexpression, purification, and characterization of wild type and $\Delta F508$ mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein." **The Journal of biological chemistry** 268: 24330-24338.1993.

KRISTIDIS, P., et al. "Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis." **American journal of human genetics** 50(6): 1178-1184.1992.

KOCH C, CUPPENS H, RAINISIO M, et al; Investigators of the ERCF.European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparisnof major disease manifestations between patients with different classes of mutations. **Pediatr Pulmonol** 2001;31(1):1–12

LANNG, S., et al. "Glucose tolerance in patients with cystic fibrosis: five year prospective study." (0959-8138 (Print)).1995.

LE CAIGNEC, C., et al. "Third case of paternal isodisomy for chromosome 7 with cystic fibrosis: A new patient presenting with normal growth." **American Journal of Medical Genetics Part A** 143A(22): 2696-2699.2007.

Lemos, A., et al. "Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos." **Jornal Brasileiro De Pneumologia - J BRAS PNEUMOL** 30.2004.

LEWIS, R. (2004). **Genética humana-conceitos e aplicações**, 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

LI, C. and NAREN, A. P. "Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners." **Pharmacology & Therapeutics** 108(2): 208-223.2005.

LOPES-PACHECO, M. "CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis." **Front Pharmacol** 7: 275.2016.

LOVETT, A., et al. "Diffuse dermatitis: An unexpected initial presentation of cystic fibrosis." **J Am Acad Dermatol** 58(S1): 1- 4.2008.

LOWE CU, MAY CD, REED SC. Fibrosis of the pancreas in infants and children: a statistical study of clinical and hereditary features. **Am. J. Dis. Child.** 78: 349-374, 1949.

MACEK, M., Jr., et al. "Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%." **American journal of human genetics** 60(5): 1122-1127.1997.

MACLUSHY, I. L., H. . "Cystic fibrosis. In: CHERNICK, V.; BOATE, T. E. Kendig's disorders of the respiratory track in children. Saunders. ." 692-729.1990.

MCCARTHY, V.A, HARRIS. A. The CFTR gene and regulation of its expression. **Journal Pediatric Pulmonology.** Oklahoma. 2005. v. 40, n.1, p.1-8.

MAHADEVA, R., et al. "Association of α -antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis." **Thorax** 56(1): 53.2001.

MALL, M., GREGER, R., SEYDEWITZ, H., KUEHR, J., BRANDIS, M., & KUNZELMANN, K. (1998a). Detection of defective cholinergic Cl⁻ secretion in human rectal biopsies for the diagnosis of Cystic Fibrosis. **J Clin Invest**, 102, 15–21.

MALL, M., BLEICH, M., GREGER, R., SCHREIBER, R. & KUNZELMANN, K. (1998b). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. **J Clin Invest.**, 102(1):15-21.

MARSON, F., et al. "Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis." **J Bras Pneumol** 39(3): p. 306-316.2013.

MARSON, F. A. L. "Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis." **Curr Opin Pulm Med** 24(3): 296-308.2018.

MARSON, F. A. L., et al. "Classification of *CFTR* mutation classes." **The Lancet Respiratory Medicine** 4(8): e37-e38.2016.

MARSON, F.A.L. **Análise de genes modificadores relacionados à gravidade clínica da fibrose cística**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo.

MASSIE, R. J. P., M.; GALZNER, J.; . "Newborns screening for cystic fibrosis in Vitoria: 10 years experience (1989- 1998)." **Medical Journal of Australia. Sidney** 172(12): p. 584-587.2000.

McKone EF, Goss CH, Aitken ML. *CFTR* genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. **Chest** 2006;130(5):1441–1447

MCCARTHY, V. A. and HARRIS, A. "The *CFTR* gene and regulation of its expression." **Pediatric Pulmonology** 40(1): 1-8.2005.

MCKUSICK, V. A. (1986, 05/08/2019: Hamosh, Ada). "**Online Mendelian Inheritance in Man, CYSTIC FIBROSIS; CF #219700.**" from <https://www.omim.org/entry/219700#>.

MEKUS, F., et al. "Categories of $\Delta F508$ homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics." **Twin Research and Human Genetics** 3: 277-293.2000.

MILLAT, G., et al. "Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the *LMNA* gene." **Clinical Biochemistry** 42(9): 892-898.2009.

MISHRA, A., et al. "The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era." **The Clinical biochemist. Reviews** 26(4): 135-153.2005.

MOTA, L., et al. "Cystic fibrosis: Identification and frequency of mutations in a mixed population from a low-income region in Northeastern Brazil." **Pediatric Pulmonology** 53.2018.

MOTA, L., et al. "Estudos genéticos sobre a Fibrose Cística no Brasil: uma revisão sistemática." **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** 14: 238.2016.

MOURA COSTA, F. M., et al. "Low frequency of the deltaAF508 mutation of the *CFTR* gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil." **Hum Biol** 79(3): 293-297.2007.

MUNIZ, A. E., et al. "Edema, anemia, hypoproteinemia, and acrodermatitis enteropathica: an uncommon initial presentation of cystic fibrosis." (1535-1815 (Electronic)

MUNCK A, GÉRARDIN M, ALBERTI C, AJZENMAN C, LEBOURGEOIS M, AIGRAIN Y, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. **J. Pediatr. Surgery** 2006; 41(9): 1556-60.

O'SULLIVAN, B. P. and FREEDMAN, S. D. "Cystic fibrosis." **The Lancet** 373(9678): 1891-1904.2009.

O'REGAN, G., et al. "Peeling paint' dermatitis as a presenting sign of cystic fibrosis." **J Cyst Fibros** 5: 257-259.2006.

OKAY, T. S., et al. "Frequency of the DF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data." **Clinics** 60: 131-134.2005.

OLIVEIRA, Y. A. "Fibrose Quística." **Dissertação (Tese de Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade da Beira Interior. Lisboa, Portugal:** p. 118.2008.

PARAD, R. B., et al. "Sweat Testing Infants Detected by Cystic Fibrosis Newborn Screening." **The Journal of Pediatrics** 147(3, Supplement): S69-S72.2005.

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.

PERONE, C., et al. "Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening." **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 43: 134-138.2010.

POLIZZI, A., et al. "Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients bearing [H939R;H949L] allele." **Genetics and molecular biology** 34(3): 416-420.2011.

POLYPHEN2. "**Polymorphism Phenotyping 2.**" Retrieved Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Accessed 5 Apr 2018.

QUINZII, C. and CASTELLANI, C. "The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility." **Journal of Endocrinological Investigation** 23(10): 684-689.2000.

RANA-DIEZ, P., et al. "Three novel mutations in the CFTR gene identified in Galician patients." **J Cyst Fibros** 7(6): 520-522.2008.

RASKIN, S., et al. "Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients." **J Cyst Fibros** 7(1): 15-22.2008.

REBRAFC **Brazilian Cystic Fibrosis Registry - Patient Registry 2015 (online)**. Disponível em: http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2015/11/Registro2015_Ingles.pdf. Accessed 5 Apr 2018.

REBRAFC **Brazilian Cystic Fibrosis Registry – patient registry 2014 (online)**. Disponível em: http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2015/11/Registro2014_Ingles.pdf. Acesso: 05/02/2018. .

REBRAFC **Brazilian Cystic Fibrosis Registry 2016**http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2016/11/Registro2016_Ingles.pdf. Accessed 5 Apr 2018.

REBRAFC **Brazilian Cystic Fibrosis Registry 2017**http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2017_Ingles.pdf. Accessed 5 Feb 2020.

REIS, F. J. C. and DAMACENO, N. "Fibrose cística" **J. pediatr. (Rio J.)** 74(Supl. 1): 76-94.1998.

REIS, F. J. C., et al. "Quadro clínico e nutricional de pacientes com fibrose cística: 20 anos de seguimento no HC-UFMG." **Revista da Associação Médica Brasileira** 46: 325-330.2000.

REIS, F.; MELO, S.O.; VERGARA, A. A. Programa de triagem neonatal para fibrose cística de Minas Gerais (PETN-FIBROSE CÍSTICA): aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Pneumologia. Minas Gerais.** 2006. v. 32, p.1-16.

RESTA, R., et al. "A New Definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force Report." **Journal of Genetic Counseling** 15(2): 77-83.2006.

RIBEIRO, J. D., et al. "Controvérsias na fibrose cística: do pediatra ao especialista." **Jornal de Pediatria** 78: 171-186.2002.

RIMOIN, D. L. (1990). **Principles and Practice of Medical Genetics**. Churchill Livingstone Second Edition.

RIORDAN, J. "Riordan, J. R. Assembly of functional CFTR chloride channels. **Annu. Rev. Physiol.** 67, 701-718." **Annual review of physiology** 67: 701-718.2005.

RIORDAN, J. R., et al. "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." (0036-8075 (Print)).1989.

ROBINSON, P. "Paediatric origins of adult lung disease bullet 7: Cystic fibrosis." **Thorax** 56: 237-241.2001.

RODRIGUES, R., et al. "Neonatal screening for cystic fibrosis in São Paulo State, Brazil: a pilot study." **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 42: 973-978.2009.

ROMMENS, J. M., et al. "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." (0036-8075 (Print)).1989

ROGERS GB, SKELTON S, SERISIER DJ, VAN DER GAST CJ, BRUCE KD. Determining cystic fibrosis-affected lung microbiology: comparison of spontaneous and serially induced sputum samples by use of terminal restriction fragment length polymorphism profiling. **Journal of Clinical Microbiology** 2010; 48(1): 78–86.

ROWE, S. M., MILLER, S., & SORSCHER, E. J. (2005). Cystic Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, 352(19), 1992–2001. doi:10.1056/nejmra043184.

ROSA, F. R., et al. "Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional." **Revista de Nutrição** 21: 725-737.2008.

ROSENSTEIN, B. J. AND CUTTING, G. R. "The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement." **The Journal of Pediatrics** 132(4): 589-595.1998.

ROZEN, R., et al. "L206W mutation of the cystic fibrosis gene, relatively frequent in French Canadians, is associated with atypical presentations of cystic fibrosis." (0148-7299 (Print))

RYLEY, H. C., et al. "Screening for cystic fibrosis. Brit. ." **Med. Bull** 48(4): p. 805-822.1992.

SALVATORE, F., et al. "Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes." **Am J Med Genet** 111(1): 88-95.2002.

SANTOS, G. P. C., et al. "Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação." **Jornal de Pediatria** 81: 240-244.2005.

SARAIVA-PEREIRA, M. L., et al. "A Genética na Fibrose Cística." **2011** 31(2).2011.

STOPPELMAN MRH, SHWACHMAN H. Effect of antibiotic therapy on mucoviscidosis: bacteriologic study. **NEJM** 1954; 251:759-763.

SCHAEDEL, C., et al. "A novel cystic fibrosis mutation, Y109C, in the first transmembrane domain of CFTR." (0964-6906 (Print))

SCHRAM, C. A. "Atypical cystic fibrosis: identification in the primary care setting." **Canadian family physician Medecin de famille canadien** 58(12): 1341-e1704.2012.

SIFT. "**Sort Intolerant From Tolerant.**" Retrieved Disponível em: <http://sift.jcvi.org/>. Accessed 5 Apr 2018

SLIEKER, M. G., et al. "Disease modifying genes in cystic fibrosis." **Journal of Cystic Fibrosis** 4: 7-13.2005.

SIMPSON JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. **Prenat Diagn.** 2010 Jul;30(7):682-95.

SOFERMAN, R. "Immunopathophysiologic mechanisms of cystic fibrosis lung disease." **The Israel Medical Association journal : IMAJ** 8: 44-48.2006.

SOKOL, R. J. and DURIE, P. R. "Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group." (0277-2116 (Print).1999.

STANKE F, BECKER T, KUMAR V, HEDTFELD S, BECKER C, CUPPENS H, et al. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic defect of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. **J Med Genet** 2010; 1-8.

STURGESS, J. M. (1982). **Morphological characteristics of bronchial mucosa in cystic fibrosis.** In: QUITON, P. M.; et al. **Fluid and electrolyte abnormalities in exocrine glands in cystic fibrosis.** . San Francisco Press. San Francisco, x: 254-270.

TOMASHEFSKI, J., et al. "Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis." (0003-0805 (Print).1986.

QUINTON, P., MOLYNEUX, L., IP, W., DUPUIS, A., AVOLIO, J., TULLIS, E., ... GONSKA, T. (2012) β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med.**, 186(8), 732-9.

VALENTIM, L. (2008). **Fibrose Cística: enfoque multidisciplinar.** Diagnostico L. N. Norberto. Florianópolis. Secretaria de Estado de Saúde: 43-58.

VAN GOOR, F., et al. "Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770." (1091-6490 (Electronic)).2014.

VANSCOY, L. L., et al. "Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis." **American journal of respiratory and critical care medicine** 175(10): 1036-1043.2007.

VERTEX PHARMACEUTICALS. Vertex Selects Two Next-Generation Correctors , VX659 and VX-445 , to Advance into Phase 3 Development as Part of Two Different Triple Combination Regimens for People with Cystic Fibrosis. 2018.

VIDIGAL, P. V. T., et al. "p.F508del in a heterogeneous cystic fibrosis population from Minas Gerais, Brazil." **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 41: 643-647.2008.

WAINWRIGHT, C. E., et al. "Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR." **N Engl J Med** 373(3): 220-231.2015.

S.G. Williams, K.M. Hayller, M.E. Hodson, D. Westaby Prognosis in cystic fibrosis. **N Engl J Med**, 327 (1992), pp. 1244-1245

WELSH, M. J. R., B.W.; ACCURSO, F.; ET AL. (2001). **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** , New York.

WILSCHANSKI M, COREY M, DURIE P, et al. Diversity of reproductivetract abnormalities in men with cystic fibrosis. **JAMA** 1996; 276(8):607–608

WHO, W. H. O. (2002). "**The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis.**" from Disponível em: http://www.cfww.org/docs/who/2002/who_hgn_cf_wg_04.02.pdf.

YANKASKAS, J. R., et al. "Cystic Fibrosis Adult Care: Consensus Conference Report." **CHEST** 125(1): 1S-39S.2004.

ZIELENSKI, J. and TSUI, L. C. "Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations." (0066-4197 (Print).1995.

ZIELENSKI J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. **Respiration** 2000;67(2):117–133

ZOLIN, A., et al. (2010). "**ECFS Patient Registry Annual Data Report. Karup: European Cystic Fibrosis Society.**" Disponível em: <https://goo.gl/vixn3J>.

APÊNDICE 1



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 permitir a participação do seu filho(a) em 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 2020.

Serão convidados os pacientes que apresentam o diagnóstico da fibrose cística confirmado e aqueles que ainda estão em investigação. Seu filho (a) pode ou não participar da pesquisa. Se quiser participar, você deverá assinar este formulário, e se possível seu filho também assinará, sendo que este deve ser preenchido em duas vias, uma que ficará em poder do responsável pela pesquisa, 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 seu filho (a).

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

Serão coletados os dados do seu filho (a) 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. Seu filho será acompanhado no ambulatório de FC e em cada consulta serão coletados os dados clínico- 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 antebraço do seu filho (a), 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 do seu filho (a) 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, seu filho (a) continuará o acompanhamento regular no próprio ambulatório.

Todas as informações coletadas sobre seu filho (a) durante a pesquisa serão mantidas em sigilo. Qualquer informação sobre seu filho(a) 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 EdnaLúcia Souza pelo telefone (71) 3283- 8333 ou no Serviço de Pneumologia Pediátrica no Ambulatório Magalhães (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 pelo telefone (71) 3283 8043.

Os resultados serão disponibilizado 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 estará declarando 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 a qualidade e a disponibilidade da assistência médica será prestada ao seu filho. 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	Data
	Impressão Digital	

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
--------------------------------	------------	------

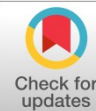
APÊNDICE2

PROTOCOLOS DE TECNICAS MOLECULARES CONVENCIONAIS

Exón / Intron	Mutação	Sequências	Fragmentos pb	Primeira Digestão			Segunda Digestão				
				Enzima Restrição	Temperatura°C	Fragmento normal, pb	Fragmento mutante, pb	Enzima Restrição	Temperatura°C	Fragmento normal, pb	Fragmento mutante, pb
11	G542X	F: CAGAGAAAGACAATATAGTTCC	112	<i>BstNI</i>	60	90, 22	112	<i>Mbol</i>	37	112	62, 50
	G551D			<i>HincII</i>	37	58, 54	112				
	R553X	R: AAATGCTTGCTAGACCAAT									
16	3120+1G->A	F: CAGAGAAATTGGTCGTTACT R: ATCTAAATGTGGGATTGCCT	570	<i>BstNI</i>	60	340, 197, 33	537, 33				
10	F508del	F: GTTTCCTGGATTATGCCTGGCAC R: GTTGGCATGCTTTGATGACGCTTC	98								
19	R1162X	F: GCTAACACATTGCTTCAGGCT R: GCCCGACAAATAACCAAGTGA	454	<i>Ddel</i>	37	275,179	179, 143, 132				
7	R334W	F: GATCTTCCATTCCAAGATCCC R: ATCATAGTATATAATGCAGC	358	<i>MspI</i>	37	206,152	358				

Apêndice II

Artigo 5 – Original



Cystic fibrosis: Identification and frequency of mutations in a mixed population from a low-income region in Northeastern Brazil

Current evidence points to the importance of a more personalized approach that takes into account the ethnicity of a population in the diagnosis of Cystic Fibrosis (CF). Recent studies have indicated that use of gene sequencing is a reliable approach to diagnose CF. Although this approach is extremely relevant, it is costly. The rational use of health resources is highly recommended, especially in low-income areas. Brazil is a country of continental dimensions and with great ethnic-racial heterogeneity. The state of Bahia, located in the Northeast of Brazil, presents a population with a high degree of miscegenation due to the characteristics of its ancestry: African (47.3%), European (36.4%), and Amerindian (16.3%).¹ The population of this state is approximately 15.2 million, most of it with low income, and only two medical centers provide clinical care for CF patients; these centers are part of the public health system, which has universal coverage in this country.²

Our center is a multidisciplinary clinic, located at the teaching Hospital of the Federal University of Bahia. Since January 2008, we have enrolled and prospectively followed patients with CF from 0 to 20 years of age. Between 2012 and 2017, 50 patients with confirmed CF diagnosis by two positive sweat tests were submitted to molecular analysis for screening of seven mutations by conventional methods using peripheral blood samples (polymerase chain reaction and enzymatic digestion), or by next-generation sequencing of oral mucosa samples using Illumina HiSeq platform whenever it was not possible to determine the patients' genotype through conventional analysis.

Of the patients studied, 26 (52%) were female, 48 (96%) were non-white, median age of 6 years. Through conventional molecular techniques, five mutations were identified, allowing us to ascertain the genotype of 25 patients. These sequencing studies identified 14 new mutations (including a new variant, not yet described in the literature), expanding to 43 (86%) the number of patients with known genotype. These findings allowed us to predict that by using a 20-mutation panel, we would be able to complete diagnostic genotyping from approximately 90% of our patients. Three patients had no mutant allele identified and whereas additional four patients presented with only one mutation. Genotypes and mutation frequencies are described in Table 1.

Advances in precision medicine require knowledge of the genotypic profiles of CF patients. However, the routine performance of genetic testing is not a reality for the vast majority of CF care centers

in Brazil. Data from the Brazilian Registry of Cystic Fibrosis (REBRAFC) from 2015 indicated that only 46.2% from 3857 patients were submitted to any genetic study.³ Thus, it is expansion in use of genetic testing is warranted to better diagnose CF. To optimize diagnosis without significantly increasing cost, we predict that development of a panel of mutations more specific to each region is highly recommended, since the use of a single panel may not be equally sensitive, particularly in regions with major heterogeneity in ethnicity such as Brazil.

The results of our study revealed that despite the high degree of miscegenation of the study population, with 96% non-white patients, the initial investigation of only F508del mutation determined the genotype of approximately 30% of patients. This finding corroborates with the proposal of an initial investigation searching only for F508del mutation, as suggested for patients from the Brazilian southeast.⁴ In our population, subsequent investigation for G542X and 3120 + 1G>A mutations expanded the genotype knowledge to 50% of patients. Thus, the establishment of a stepwise protocol, with the research of only three mutations, can optimize the use of public health resources and increase the access to molecular diagnosis techniques. The other mutations, found only through sequencing, can be incorporated into a specific panel for this region of Brazil, reserved only for patients whose genotype could not be determined by the initial investigation.

Identifying the genotypes of our patients allowed us to discover that 42% of these were eligible for precision medicine treatment: 14 (28%) patients F508del/F508del—Lumacaftor/Ivacaftor or Tezacaftor/Ivacaftor combination; 3 (6%) patients were suitable to use Ivacaftor and 3 (6%) patients for the use of the association Tezacaftor/Ivacaftor or Ivacaftor.⁵ Furthermore, due to low availability of other diagnostic resources such as CFTR function evaluation or periodic dosing of fecal elastase to investigate pancreatic insufficiency, genotype determination has firmly contributed to improve treatment strategies for our patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB—Research Support Foundation of the State of Bahia) and by Brazilian Cystic Fibrosis Study Group (GBEFC).

TABLE 1 Description of the *CFTR* mutations screened in patients with cystic fibrosis in a reference center in Bahia, Brazil

Genotype	Frequency	Precision medicine
F508del/F508del	14 (28%)	Yes ^{a,c}
F508del/3120 + 1G > A	7 (14%)	No
F508del/G542X	3 (6%)	No
F508del/D1152H	1 (2%)	Yes ^{b,c}
F508del/S466X	1 (2%)	No
F508del/3272-26A > G	1 (2%)	Yes ^{b,c}
F508del/E1409K	1 (2%)	No
F508del; 11TG/5T	1 (2%)	No
F508del/W1282X	1 (2%)	No
F508del/Unknown	2 (4%)	-
G542X/G542X	1 (2%)	No
G542X/R1162X	1 (2%)	No
G542X/R334W	1 (2%)	No
G542X/V201M	1 (2%)	No
R1162X/R1162X	1 (2%)	No
R334W/R334W	1 (2%)	No
Q1100P/Q1100P	1 (2%)	No
Q1100P/N1303K	1 (2%)	No
G1069R/Y109C; 5T/12TG	2 (4%)	Yes ^b
G1069R; TG11/5T	1 (2%)	Yes ^b
L206W/A107P	1 (2%)	Yes ^{b,c}
2307insA/K162E	1 (2%)	No
Heterozigoto 5T	1 (2%)	No
11TG/7T e 11TG/5T	1 (2%)	No
Unknown/Unknown	3 (6%)	-

Alleles	Mutation class	Frequency	Brazil*
F508del	II	46/100 (46%)	48.7%
3120+1G>A	I	7/100 (7%)	1.1%
G542X	I	8/100 (8%)	4.3%
R1162X	I	3/100 (3%)	1.1%
R334W	IV	3/100 (3%)	1.2%
D1152H	IV	1/100 (1%)	0.2%
S466X	I	1/100 (1%)	-
3272-26A > G	V	1/100 (1%)	0.1%
E1409K	-	1/100 (1%)	-
V201M	-	1/100 (1%)	-
Q1100P	-	3/100 (3%)	-
N1303K	II	1/100 (1%)	0.9%
G1069R	III	3/100 (3%)	-
Y109C	-	2/100 (2%)	-
L206W	II	1/100 (1%)	0.1%
A107P	-	1/100 (1%)	-
2307insA	I	1/100 (1%)	0.03%
K162E	-	1/100 (1%)	(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Alleles	Mutation class	Frequency	Brazil*
W1282X	I	1/100 (1%)	0.4%
Alelo 5T	-	4/100 (4%)	-
Not identified	-	10/100 (10%)	-

*Based on Brazilian Registry of Cystic Fibrosis (REBRAFC)—patient registry 2015.

^aEligible for Lumacaftor/Ivacaftor combination.

^bEligible for Ivacaftor.

^cEligible for Tezacaftor/Ivacaftor combination.

ETHICAL PUBLICATION STATEMENT

We have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

ORCID

Edna L. Souza  <http://orcid.org/0000-0002-4916-8483>

Lais R. Mota¹, Lorena L. de Castro², Tatiana de Anunciação Ferreira³, Renata Lúcia F. de Lima⁴, Maria Betânia P. Toralles⁵, Edna Lúcia Souza^{3,5*} *Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil*

²*School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil*

³*Teaching Hospital Professor Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brazil* ⁴*Department of Biology, Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil*

⁵*Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil*

*Correspondence

Edna Lúcia Souza, Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Avenue Santa Luzia, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brazil. Email: souza.ednalucia@gmail.com, ednalu@ufba.br

REFERENCES

1. Abe-Sandes K, Bomfim TF, Machado TMB, et al. Genomic Ancestry, socioeconomic status and vulnerability to HIV/AIDS in Bahia, Brazil. *Saude Soc.* 2010;19:75-84.
2. IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). Characteristics of the population and domiciles of Census 2010. Homepage: www.ibge.gov.br. Accessed: 28 Jan, 2018.
3. Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC)—patient registry 2014 (online). http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2014_Ingles.pdf. Accessed: 05 Feb, 2018.
4. Marson FA, Bertuzzo CS, Ribeiro MÂ, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2013;39:306-316.
5. Kirby T. Tezacaftor-ivacaftor is safe and efficacious in patients with cystic fibrosis with Phe508del mutations. *Lancet Respir Med.* 2018;6:13-14.



Description of rare mutations and a novel variant in Brazilian patients with Cystic Fibrosis: a case series from a referral center in the Bahia State

Láís Ribeiro Mota¹ · Valmir Machado de Melo Filho² · Lorena Lemos de Castro² · Daniel Fantozzi Garcia³ · Regina Terse-Ramos⁴ · Maria Betânia Pereira Toralles⁴ · Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima⁵ · Edna Lúcia Souza⁴

Received: 4 May 2018 / Accepted: 5 September 2018
 © Springer Nature B.V. 2018

Abstract

Knowledge of the genetic profile of Cystic Fibrosis (CF) contributes to a better understanding of the genotype/phenotype relationship, particularly in mixed populations such as in Brazil. To describe clinical data of CF patients with rare or not yet observed *CFTR* gene mutations in Brazil. It was a case series of CF patients followed-up at a referral center. Clinical and laboratory data were obtained through medical records. Molecular analysis of the mutations was performed by conventional methods and/or by next-generation sequencing. Ten patients were studied, seven had five pathogenic mutations without previous description in Brazil (Q1100P, Y109C, A107P, E1409K and K162E), one of which has not yet been reported in patients with CF (A107P). Among the seven patients, three (two siblings) had the second mutant allele of rare occurrence among Brazilians patients (G1069R and 2307insA). Three other patients also had at least one rare variant (V201M, S466X and G1069R). The age of the CF diagnosis ranged from 1 to 190 months in the ten cases and the main clinical manifestations were respiratory symptoms and difficulty in gaining weight. All but one patient presented clinical and/or laboratory data compatible with pancreatic insufficiency. The identification of rare or not yet described *CFTR* mutations in patients with CF in Brazil highlights the high genetic heterogeneity in this population. Knowledge of the genotypic profile of Brazilian CF patients can contribute to the development of specific mutation panels for the genetic investigation targeting each region of the country, as well as helping to understand the complex genotype/phenotype relationship, especially in mixed populations.

Keywords Mutation · Mucoviscidosis · Genotype · *CFTR*

* Edna Lúcia Souza
 souza.ednalucia@gmail.com; ednalu@ufba.br

Láís Ribeiro Mota
 laisrm@ufba.br; lais_rmota@hotmail.com

Valmir Machado de Melo Filho
 valmir.melof@gmail.com

Lorena Lemos de Castro
 lorenalemoscastro@yahoo.com

Daniel Fantozzi Garcia
 dfgarcia@usp.br; danielfantozzi@gmail.com

Regina Terse-Ramos
 regina.ramos@ufba.br; reginaterse@gmail.com

Maria Betânia Pereira Toralles
 m.toralles@uol.com.br

Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima
 fdelima@ufba.br

¹ Post-Graduation Program in Interactive Processes of Systems and Organs, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

² School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

³ Clinical Hospital of School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Salvador, Brazil

⁴ Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, Avenida: Santa Luzia, 379/902. Horto Florestal, Salvador, Bahia CEP:40295-050, Brazil

⁵ Department of Biology, Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease among Caucasians. It is caused by mutations in the *CFTR* gene, for which more than 2000 variants have been described that are distributed differently in the various geographical areas [1,2]. Knowledge of the genetic profile contributes, among other factors, to a better understanding of the genotype/phenotype relationship, particularly in mixed populations. More recently, genotype determination could predict patients who will benefit from precision treatment already available to some individuals [3].

In Brazil, there is great diversity in the knowledge of the genetic profile of CF between the States, since the studies carried out are concentrated in the south and southeast regions, which makes it difficult to generalize about the clinical-epidemiological and genetic profile of the disease in the country [4] considering the high rates of miscegenation in Brazilian populations. An estimate of the most prevalent mutations can be made from the annual data of the Brazilian Registry of Cystic Fibrosis (REBRAFC) [5], where only 46% of the patients performed any genetic study. The F508del mutation was the most commonly detected, with an allelic frequency of 48.7%.

Bahia, located in Brazil's northeast, is one of the states with the highest miscegenation rates due to more than five centuries of ethnic admixture among Africans, Europeans and Amerindians [6]. Currently, only two centers provide assistance to the CF patients in the state and the genetic profile of this population is only partially known [7]. In addition, the neonatal screening for CF through the dosage of immunoreactive trypsin (IRT) only started in 2013 in Bahia, so it is safe to say there is underdiagnosis of the disease, especially considering patients born before 2012 and the low clinical suspicion by pediatricians added to the multiple clinical manifestations. This study was performed at a Teaching Hospital, which is one of the two medical centers that provide multidisciplinary care to CF patients in the state of Bahia. The objective of this study was to describe clinical data of CF patients with rare or not yet observed *CFTR* gene mutations in Brazil.

Methods

This study is a case series of patients with confirmed CF diagnosis by two positive sweat tests, carried on from January 2008 to December 2017 at a reference center which follows-up 51 CF patients with up to 20 years of age. Medical charts were reviewed and sociodemographic, clinical and laboratory data were recorded. After CF diagnosis, all patients were submitted to molecular analysis to determine

CFTR gene mutations by conventional methods (polymerase chain reaction and enzymatic digestion) searching for seven mutations using peripheral blood samples. If two pathogenic alleles were not found, a secondary analysis by Next Generation sequencing was done to capture all of *CFTR* exons. Sequencing was performed after library construction using all Illumina HiSeq sequencer, paired-end reads 2×75 bp. The analysis of the genotyped variants was done through the alignment of the sequence to human reference genome (hg19) using BWA-MEM and Genome Analysis Toolkit (GATK), according to Broad Institute's best practices, as well as algorithmic genotyping of copy-number variants (for large insertions and duplications). Annotation and variant pathogenicity prediction were obtained using Mendelics Abracadabra software and mutations identified were compared to control population frequencies.

Results

Ten patients were studied, seven had five pathogenic mutations without previous description in Brazil (c.3299A > C [Q1100P], c.326A > G [Y109C], c.319G > C [A107P], c.4225G > A [E1409K] and c.484 A > G [K162E]), one of them not yet described in CF patients worldwide (A107P). Among the seven patients, three (two siblings) had the second mutant allele of rare occurrence in Brazil (c.3205G > A [G1069R] and c.2175_2176insA [2307insA]). Only one patient was Q1100P homozygous while the others were compound heterozygous. Three other patients also had at least one rare variant (c.601G > A [V201M] and c.1397C > A [S466X], c.3205G > A [G1069R]). Table 1 presents the clinical and laboratory data of the ten patients with mutations not yet described or very rare in Brazil.

Discussion

The c.3299A > C (Q1100P) replacement in exon 20 (Case 1—homozygous and Case 2—Q1100P/N1303K) was first described in a Spanish boy with CF diagnosed at age three. That child was heterozygous for F508del mutation, had pancreatic insufficiency (PI) and was colonized by *Pseudomonas aeruginosa* [8], which is similar to the cases described here. This mutation has no functional class categorization yet; however, it is considered definitely pathogenic (personal communication, Mendelics Laboratory)¹. Case 2

¹ Personal communication, Mendelics Laboratory. The annotation and prediction of pathogenicity was done by the Mendelics laboratory using Abracadabra software as well as consulting the Human Genome Mutation Database and ClinVar Database.

Table 1 Description of genotype and phenotype of ten CF patients with rare or not yet described mutations among Brazilian patients

Clinical data	Case 1 Female	Case 2 Female	Case 3 ^f Female	Case 4 ^f Female	Case 5 Male	Case 6 Male	Case 7 Male	Case 8 Male	Case 9 Male	Case 10 Male
Genotype (Allele 1/ Allele 2)	(Q1100P/ Q1100P)	(Q1100P/ N1303K)	(Y109C/ G1069R) 5T/12TG	(Y109C/ G1069R) 5T/12TG	(A107P/ L206W)	(K162E/2307insA)	(F508del/ E1409K)	(G1069R; TG11/5T- TG10-9T)	(G542X/ V201M)	(F508/S466X)
Current age (in years)	12 years and 1 month	2 years and 8 months	7 years and 1 month	2 years and 9 months	6 years and 3 months	3 years and 1 month	3 years and 1 month	3 years and 5 months	1 years and 6 months	18 years and 6 months
Age at diagno- sis (in years)	1 years and 1 month	5 months	9 months	2 months	3 years and 5 months	4 months	2 years and 6 months	1 years and 6 months	1 month 8 months	15 years and
Clinical find- ings that justified the diagnosis	Respiratory symptoms, altered intes- tinal rhythm (steatorrhea, chronic diar- rhea), diffi- culty gaining weight	Respiratory symptoms, diarrhea without steatorrhea, hepatobiliary disease, diffi- culty gaining weight, IRT elevation, hydro- electrolytic disturbances, edema, anemia	Difficulty gain- ing weight, dehydration, chronic diar- rhea	IRT elevation, family his- tory, altered intestinal rhythm	Respiratory symptoms	Respiratory symptoms, altered intestinal rhythm (steatorrhea), difficulty gaining weight, dehydra- tion, vomits and regurgitation	Respiratory symptoms, altered intes- tinal rhythm (steatorrhea)	Growth retar- dation difficulty gain- ing weight	IRT elevation symptoms, altered intes- tinal rhythm (steatorrhea), difficulty gaining weight and abdominal pain	Respiratory intestinal rhythm, difficulty gaining weight and abdominal pain
Follow-up time (in years)	10 years	2 years and 5 months	6 years and 6 months	2 years and 9 months	2 years and 6 months	2 years and 10 months	6 months	6 months	1 years	2 years and 10 months
Nutritional status at diagnosis	Eutrophic weight and low height	Very low	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Malnutrition
Current nutri- tional status	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic	Eutrophic
Meconium ileus	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CF Neonatal Screening (IRT >70 ng/ mL)	Not performed	IRT elevated (70)	Not performed	IRT elevated (84)	Not Performed (70)	IRT normal	IRT normal	IRT normal	IRT elevated	Not Performed
Chloride levels (mEq/L) ^a	111–106/115– 98	102–96/86–84 102	111–92/87–92	70–65/74–71	73–70/78–81	66–69/75–79	71–70/69–66	69–72/54–58	67–62/60–63	105–102/106–
Fecal elastase dosage (μ E1/g)	<15.0	<15.0	526.7	432.9	497.69	427.6	430.2	Not performed	Not performed	<15.0

Table 1 (continued)

Clinical data	Case 1	Case 2	Case 3 ^f	Case 4 ^f	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10
Female	Female	Female	Female	Female	Male	Male	Male	Male	Male	Male
Steatorrhea (at the moment)	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Use of enzymes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Pulmonary function ^b	FEV ₁ : 2,92 (114%)	Not performed (94%)	Not performed	Not performed	Not performed	Notperformed	Not performed	Not performed	Not performed	FEV ₁ :3,46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection	Intermittent ^c	Free of PA ^d	Never infected	Never infected	Never infected	Neverinfected	Never infected	Intermittent ^c	Free of PA ^d	Chronic ^e
Age of the first colonization by <i>Pseu- domonas aeruginosa</i>	8years	1years	–	–	–	–	–	29 months	–	–

^aThe results express the levels of Chloride n sweat in the two tests that led to the diagnosis of CF

^bPerformed only in children older than 6 years

^cMore than 1 episode of the positive cultures in 12 months

^dOnly 1 episode of the positive cultures in 12 months

^eChronic

^fCases 3 and 4 are sisters


```

LLLGRIIASYDPDNKEERSIATYLG I Homo sapiens (human)
LLLGRIIASYDPDNKEERSIATYLG I Pan troglodytes (chimpanzee)
LLLGRIIASYDPDNKEERSIATYLG I Macaca mulatta (Rhesusmonkey)
LLLGRIIASYDPDNKQERSIATYLA I Canis lupus familiaris (dog)
LLLGRIIASYDPDNKVERSIATYLG I Bos taurus (cattle)
VLLGRIIASYDPENKVERSIATYLG I Mus musculus (house mouse)
VLLGRIIASYDPDNTEERSIATYLG I Rattus norvegicus (Norwayrat)
LLLGRIIASYDPDNSSERSIATYLG I Gallus gallus (chicken)
QLLGRIIASYDPAHEPERANGYFLAF Danio rerio (zebrafish)
LLLGRIIASYDRDNEHERSIAYLAI Xenopus tropicalis (frog)

```

Fig. 1 Multiple alignments demonstrating the identified variant A107P located in a conserved region of the CFTR protein in different species

was submitted to neonatal screening, with IRT elevation, but the diagnosis was only made after clinical manifestations (low weight and height, hydroelectrolytic disorders and hepatitis associated with cytomegalovirus infection), which reveals failures in the follow-up after neonatal screening and reinforces the importance of public awareness studies and public health policies regarding CF in Brazil. The suspicion of the disease is still low among Brazilian pediatricians, which leads to underdiagnosis.

The c.326A>G(Y109C) replacement in exon 4 (Cases 3 and 4—Y109C/G1069R; 5T/12TG), considered to be definitively pathogenic, was first described in a child with the 3659delC/Y109C genotype, pancreatic sufficiency, recurrent episodes of *Staphylococcus aureus* infections and some *P. aeruginosa* positive cultures but no chronic colonization [9].

Although the current literature points to pancreatic sufficiency in patients with this mutation, the children described here (two sisters) have complaints of steatorrhea, despite normal levels of fecal elastase. It is possible that the genotype presented by the patients (associated with the presence of 5T allele) contributes to the occurrence of PI [10,11].

The c.319 G > C (A107P) replacement in exon 4 causes the p.Ala107Pro variant (Case 5—A107P/L206W) and promotes the substitution of amino acid alanine at position 107, which is a conserved amino acid among different species, by proline (Fig. 1). Based on in silico tools using SortIntolerant From Tolerant (SIFT) and Polymorphism Phenotyping 2 (PolyPhen2) the p.Ala107Pro variant is predicted as tolerant (score 0.25) and probably pathogenic (score 1.00) respectively [12, 13]. This mutation has not been described in public databases such as 1000 Genomes, ExAC Browser Beta and NHLBI Exome Sequencing Project [14–16]. Using EV mutation [17], a methodology that can be used to evaluate the quantitative effects of gene mutations in an organism, the variant A107P presented – 82.504 epistatic prediction, – 50.680 independence prediction, 0.000543323 frequency and 0.2074 of conservation, which suggests the pathogenic effect of this variant. A different variant at codon 107 (p.Ala107Val, reported as A107V) has been described in heterozygosis with the F508del mutation in a subject with Cystic Fibrosis phenotype [18]. Case 5 is

```

MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Homo sapiens (human)
MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Pan troglodytes (chimpanzee)
MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Macaca mulatta (Rhesus monkey)
MQIRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Canis lupus familiaris (dog)
MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Bos taurus (cattle)
MQMRTAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Mus musculus (house mouse)
MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKISI Rattus norvegicus (Norway rat)
MQIRIALFSLIYKTKLKLSSRVLDKIST Gallus gallus (chicken)
MQIRIALFSLIYKTKLKLSSRVLDKIST Danio rerio (zebrafish)
MQMRIAMFSLIYKTKLKLSSRVLDKIST Xenopus tropicalis (frog)

```

Fig. 2 Multiple alignments demonstrating the identified variant K162E located in a conserved region of the CFTR protein in different species

a compound heterozygous (A107P/L206W), with positive sweat tests and CF-compatible symptoms, suggesting that this mutation is actually pathogenic. Among the ten patients described, this

is the only one classified as pancreatic sufficient. The second mutation found is relatively common in French Canadians and is generally associated with a milder phenotype [19,20].

Therefore, it is not possible to associate this patient's pancreatic sufficiency with the A107P mutation. Future studies of functional analysis using biochemical and electrophysiological tests should be developed to clarify the pathogenicity of this variant and in which class this mutation should be included.

The replacement c.484 A > G (K162E) in exon 4 (Case 6—K162E/2307insA) was only reported in one subject of Greek origin, without lung or pancreatic disease, with inconclusive sweat test and heterozygous compound with F508del [1]. It is classified as a mutation of uncertain significance, but the amino acid lysine at position 162 is conserved in different species (Fig. 2). Considering in silico analysis using SIFT, the variant is predicted as tolerant (score 0.42) and using PolyPhen2 it is calculated as probably pathogenic (score 0.999) [12, 13]. Case 6 presents IP-compatible clinical features, despite normal fecal elastase levels, positive sweat tests and clinically compatible with CF, suggesting that K162E mutation is indeed pathogenic.

The substitution c.4225G>A(E1409K) in exon 26 (Case 7—F508del/E1409K) was previously described in a Spanish patient with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and compound heterozygous for the N1303K mutation [1]. This is a variant of uncertain meaning, but the glutamic acid at position 1409 is conserved among different species (Fig. 3). Considering in silico analysis using SIFT, the variant is predicted to be tolerant (score 0.11) and using PolyPhen2 it is calculated as possibly pathogenic (score 0.859) [12,13]. Case 7 has F508del/E1409K genotype, CF-compatible clinical manifestations including steatorrhea, and an elevated level of chloride in sweat, suggesting that this mutation is in fact pathogenic.

This study also reported four other mutations reported only once in Brazilian CF patients. The c.3205G > A mutation (G1069R) has been described in a heterozygous

VILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVR	Homo sapiens (human)
VILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVR	Pan troglodytes (chimpanzee)
VILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVR	Macaca mulatta (Rhesusmonkey)
VILSEHRIEAMLECCQFLVIEDSRLR	Canis lupus familiaris (dog)
VILSEHRIEAMLECCQRFVIEENKVR	Bos taurus (cattle)
VILCEHRIEAMLDCCQFLVIEESNVV	Mus musculus (house mouse)
VVLCEHRIEAMLDCCQFLVIEQGNVW	Rattus norvegicus (Norwayrat)
VVLSEHRIEALILECCQFLVIEDNKMR	Gallus gallus (chicken)
ILLSEHKVEPLLECCSFLMMDKQGVK	Danio rerio (zebrafish)
VILSEHRIEAMLECCQFLVIEDNTVR	Xenopus tropicalis (frog)

Fig. 3 Multiple alignments demonstrating the identified variant E1409K located in a conserved region of the CFTR protein in different species

patient with the second mutation unidentified [21]; this study detected this variant in two sisters (Y109C/G1069R; 5T/12TG), Cases 3 and 4, and in one pancreatic insufficient patient (G1069R; 5T/TG11), with recurrent episodes of respiratory infections and chronic cough, growth retardation and difficulty gaining weight at diagnosis and recurrent pancreatitis. The c.601G > A (V201M) mutation classified as of uncertain significance has already been reported in heterozygosis in a patient who did not have these second mutation identified [22]. In this study, one patient with G542X/V201M genotype was diagnosed by neonatal screening. The c.1397C > A (S466X) mutation described previously in a Brazilian patient with the genotype (R1070Q; S466X/G542X) [23], was found in the present study in one case (S466X/F508del), diagnosed with FC at 15 years of age due to recurrent respiratory infections, malnutrition and chronic colonization by *P. aeruginosa* mucoid strain and laboratory confirmation of pancreatic insufficiency. Despite the late diagnosis, chronic lung colonization and two severe mutations, the patient has been responding very well to the treatment (3 years of follow-up): he has good pulmonary function, nutritional recovery and did not present any respiratory exacerbation during follow-up. These second mutation of Case 6, c.2175_2176insA (2307insA), was reported in REBRAFC 2014 [24] with allelic frequency of 0.3% (heterozygosis in only one patient).

Brazil is the seventh country in number of CF patients registered [25] and despite the Brazilian population having an elevated degree of miscegenation, constituting a tri-hybrid (original inhabitants, Africans and descendants of Europeans) with European matrix representing 48% of the population [26], the ethnic composition is highly variable in the different Brazilian geographic regions, which affects the frequency of each *CFTR* gene mutation. Therefore, it is necessary to use a specific investigation panel for each region in the country [21]. Data from the REBRAFC shows that the F508del mutation is the most frequent in Brazil with allele frequency of 48.7% [5], below the global frequency (85%) [25]. A previous study at our center highlighted the importance of researching the F508del mutation but also emphasized the relevance of knowledge about

Molecular Biology Reports

the genetic profile of CF patients in admixed populations since mutations from different ethnic origins were identified, including those studied here. Further, the development of precision medicine, which made available some CFTR modulators (specific treatments to restore expression, function, and stability of CFTR) has resulted into new perspectives and progress regarding patients treatment, including those with the F508del mutation [25].

Among the limitations of the present study it can be highlighted the evaluation of only pediatric patients from a single referral center, unavailability of functional tests to assess the effect of new *CFTR* variant, the difficulties for functional respiratory evaluation in patients younger than 6 years and the adversities of further investigation into pancreatic insufficiency due to impossibility of periodic repetition of fecal elastase dosage and other diagnostic methods.

The results of this study provided the means for identification and description of patients with rare mutations and those without previous description in Brazil (one not yet described in the literature). These results highlight the high genetic heterogeneity of this population. Knowledge of the genotypic profile of Brazilian CF patients in different geographic regions can contribute to the development of specific panels for CF genetic investigation in each region of the country, making this diagnostic tool more accessible. The first description of the A107P mutation in a CF patient highlights the need to report the disease pattern in mutations classified as of uncertain significance, to categorize them and to better understand CF. Additional information on the genotype-phenotype correlation was also presented, which may contribute to greater clinical suspicion of the disease that is still underdiagnosed in the country, due to difficulties in the differential diagnosis with other pathologies and the incomplete coverage of neonatal screening.

Acknowledgements To parents and patients who agreed to participate in this study and to the Brazilian Cystic Fibrosis Study Group for making sequencing available to the patients of this center.

Funding Our study was funded by Foundation for Research Support of the State of Bahia (FAPESB—PPSUS020/2013) and Brazilian Group of Studies on Cystic Fibrosis (GBEFC).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Teaching Hospital Professor Edgard Santos research ethics committee (protocol 121/2011). We have read the Journal's position about ethical standards and affirm that this report

is consistent with the guidelines in the Committee on Publication Ethics (COPE).

Informed consent Informed consent form was assigned by each participant or their legal representative.

References

1. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>. Accessed 6 Apr 2018
2. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19(6):575–606
3. De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 4(8):662–674
4. Mota LR, Souza EL, Rocha PHSA, Vieira MJF, dos Santos JF, Lage VMGB et al (2015) Estudos genéticos sobre a fibrose cística no Brasil: uma revisão sistemática. *Rev Ciênc Méd Biol* 14(2):238–245
5. Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC)—Patient Registry 2015. http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2015_Ingles.pdf. Accessed 5 Apr 2018
6. Abe-Sandes K, Bomfim TF, Machado TMB, Abe-Sandes C, Acosta AX, Alves CRB et al (2010) Genomic ancestry, socioeconomic status and vulnerability to HIV/AIDS in Bahia, Brazil. *Saude Soc* 19(2):75–84
7. Mota LR, de Castro LL, da Anunciação Ferreira T, de Lima RL, Toralles MB, Souza EL (2018) Cystic fibrosis: identification and frequency of mutations in a mixed population from a low-income region in Northeastern Brazil. *Pediatr Pulmonol* 53:1006–1008
8. Chillón M, Casals T, Gimenez J, Ramos MD, Palacios A, Moral N et al (1994) Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet* 93:447–451
9. Schaedel C, Kristofferson A-C, Kornfalt R, Holmberg L (1994) A novel cystic fibrosis mutation, Y109C, in the first transmembrane domain of CFTR. *Hum Mol Genet* 3:1001–1002
10. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S et al (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332(22):1475–1480
11. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 3:151–156
12. Sort Intolerant From Tolerant—SIFT. <http://sift.jcvi.org/>. Accessed 5 Apr 2018
13. Polymorphism Phenotyping 2—PolyPhen2. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Accessed 5 Apr 2018
14. 1000 Genomes Project. <http://www.internationalgenome.org/>. Accessed 5 Apr 2018
15. ExAC Browser Beta. <http://exac.broadinstitute.org>. Accessed 5 Apr 2018
16. NHLBI Exome Sequencing Project. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>. Accessed 5 Apr 2018
17. Hopf TA, Ingraham JB, Poelwijk FJ, Schärfe COI, Springer M, Sander C et al (2017) Mutation effects predicted from sequence co-variation. *Nat Biotechnol* 35(2):128–139
18. Rana-Diez P, Colon C, Alonso-Fernandez JR, Solar A, Barros-Tizon JC, Barros-Casas D et al (2008) Three novel mutations in the CFTR gene identified in Galician patients. *J Cyst Fibros* 7:520–522
19. Rozen R, Ferreira-Rajabi L, Robb L, Colman N (1995) L206W mutation of the cystic fibrosis gene, relatively frequent in French Canadians, is associated with atypical presentations of cystic fibrosis. *Am J Med Genet* 57:437–439
20. Clain J, Lehmann-Che J, Duguéperoux I, Arous N, Girodon E, Legendre Metal (2005) Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mutat* 25:360–371
21. Fauz FR, Gimenez J, Ramos MD, Pereira-Ferrari L, Estivill X, Raskin S et al (2007) Cystic fibrosis in a southern Brazilian population: characteristics of 90% of the alleles. *Clin Genet* 72:218–223
22. Bernardino ALF, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CEA, Nakaie CMA, Gomes CET, Damaceno N et al (2000) Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test* 4(1):69–74
23. Furlan LL, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DR, Marson FA (2017) Variants in the interleukin 8 gene and the response to inhaled bronchodilators in cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J)* 93:639–648
24. Brazilian Cystic Fibrosis Registry (REBRAFC)—Patient Registry 2014. http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2014_Ingles.pdf. Accessed 5 Apr 2018
25. Lopes-Pacheco M (2016) CFTR modulators: shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front Pharmacol* 7:275
26. IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Brazilian census (2010) <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed 1 Aug 2018

Apêndice IV

Artigo 4 – Original

Unusual presentation of cystic fibrosis as diffuse dermatitis

Sir,

Cystic fibrosis is one of the most common autosomal recessive disorders among Caucasians. Most of the presentations are related to lung disease and exocrine pancreatic deficiency. Severe dermatitis is a rare initial presentation of the disease.¹

A non-Caucasian 5-month-old boy born at term to unrelated parents (weight 3.900 g) was healthy and exclusively breastfed until 4 months of age when he developed an erythematous eruption on the chest. The child was evaluated and diverse diagnoses were proposed: atopic dermatitis, contact dermatitis and scabies. The lesions were treated with several topical formulations including corticosteroids, antibiotics and antifungals, with no resolution. Following this, the rash became generalized and the patient further developed cough and wheeze; therefore, oral antibiotics were prescribed. However, as his general condition worsened, and he also developed edema on his lower limbs, he was transferred to Teaching Hospital Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brazil. Upon admission, the patient was very irritable with generalized edema, wheezing and diffuse erythematous papules with overlying scaling or peeling of skin involving face, chest, limbs and genital area [Figures 1 and 2]. Body weight and length recorded were 7.090 kg and 62.2 cm, and his nutritional evaluation showed a weight/age (W/A) Z-score = +0.99; height/age (H/A) Z-score = -1.75 and weight/height (W/H) Z-score = -0.52. Mucosal examination was normal and no abnormalities were found. Abnormal laboratory values were as follows: hemoglobin 9.7 g/dL, albumin 1.8 g/dL, aspartate aminotransferase 116 IU/L, alanine transaminase 60 IU/L, Na^+ 133 mEq/L. Blood, urine and faecal cultures were negative. Initial diagnosis was drug eruption with secondary hypoalbuminemia. However, cystic fibrosis was investigated for and he presented two positive sweat tests (chloride 99/98 and 86/85 mEq/L). The sweat osmolarity was 22% and oropharyngeal



Figure 1: Five-month-old patient presenting with generalized edema, wheezing and erythematous papules with overlying diffuse desquamation

cultures isolated *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. A genetic test was performed and the mutations F508del and 3120+1G>A were identified. Fecal elastase-1 level was lower than 15 $\mu\text{E}/\text{g}$. Pancreatic enzyme replacement was instituted, as well as vitamins, antibiotics and nutritional therapy. The patient exhibited improvement in skin lesions, edema and nutritional status. He was discharged in good clinical condition after 37 days of hospitalization. Currently, he is 7 years old and is being followed-up as an outpatient at the same multidisciplinary cystic fibrosis clinic with good nutritional status: W/A Z-score = 0.6; H/A Z-score = -0.1; body mass index Z-score = +1.38, and stable clinical parameters [Figures 3 and 4].

Severe and generalized dermatitis as an initial presentation is rare and approximately 30 cases have been described.^{1,2} Edema, anemia and malnutrition are serious clinical manifestations of cystic fibrosis in infants. It usually occurs in infants with ages varying from 2 weeks to 15 months old.¹ The rash typically appears as erythematous papules which evolve in weeks to months into extensive plaques with desquamation. The lesions are first noted in perioral and diaper areas and extremities; subsequently, the dermatitis can become generalized with no response to topical formulations,



Figure 2: Five-month-old boy presenting with generalized edema, wheezing and erythematous papules with overlying desquamation involving face, back and limbs



Figure 3: Patient's recovery after a few weeks of treatment showing initial regression of edema and skin lesions

including corticosteroids, antibiotics, antifungals or oral zinc supplementation.¹

The skin lesions could be mistaken for other diseases, delaying the diagnosis and appropriate treatment. Differential diagnosis of this kind of rash without associated systemic manifestations includes atopic dermatitis, psoriasis, seborrheic dermatitis, Langerhans cell histiocytosis, immunodeficiency syndromes and acrodermatitis enteropathica. Kwashiorkor and essential fatty acids deficiency must be included in the differential diagnosis, especially if other clinical features are present.¹⁻³ This patient was previously diagnosed with atopic dermatitis, contact dermatitis and scabies.

Edema, gastrointestinal and pulmonary symptoms usually occur 1–2 months after the beginning of the rash; these symptoms were also noted in the case described. Laboratory abnormalities include hypoproteinemia, hypoalbuminemia, anemia, low cholesterol, zinc deficiency, undetectable liposoluble vitamins, steatorrhea, elevated transaminases and alkaline phosphatase.^{1,2,4} Most of these abnormalities were observed in our patient.

The etiopathogenesis of the skin changes in cystic fibrosis still remain elusive, but it is apparently related to concomitant deficiencies of protein, zinc, essential fatty acids and possibly copper.³⁻⁵ The essential fatty acids deficiency occurs even in patients who have pancreatic sufficiency.⁴ Furthermore, children are more susceptible to essential fatty acids deficiency due to high metabolic demands.²

This atypical clinical presentation of cystic fibrosis may be mistaken for dermatitis of different etiologies, and the presence of edema and protein deficiency, which can cause false negativity in the sweat test, can contribute to diagnostic delay.^{2,3} Moreover, there are no pathognomonic histopathologic findings of this rash, and the microscopic aspect of the lesion is common to various diseases such as eczematous dermatitis, seborrheic dermatitis and drug reactions.¹

Early diagnosis and proper cystic fibrosis treatment are crucial for this clinical presentation since it is associated with poor prognosis and the lesions may evolve with secondary infection and septicemia, a life-threatening condition whose sequelae can be severe and progress



Figure 4: Patient after a few years of cystic fibrosis treatment with adequate growth and nutritional status

to death.^{1,3} Nevertheless, the rash usually improves after 2 weeks of nutritional therapy and pancreatic enzyme replacement, as in this case.¹

Declaration of patient consent

The authors certify that they have obtained all appropriate patient consent forms. In the form, the legal guardian has given his consent for images and other clinical information to be reported in the journal. The guardian understands that names and initials will not be published and due efforts will be made to conceal patient identity, but anonymity cannot be guaranteed.

Financial support and sponsorship

This work was partially supported by the Research Support Foundation of the State of Bahia (FAPESB) PPSUS 020/2013.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

**Bianca Sampaio Bonfim, Laís Ribeiro Mota¹,
Carolina de Godoy Almeida²,
Ana Paula de Brito Aguiar³,
Renata Lúcia Leite Ferreirade Lima⁴,
Ângela Peixoto de Mattos⁵, Edna Lúcia Souza⁵**

School of Medicine of Bahia, Federal University of Bahia, ¹Post-Graduation Program in Interactive Processes of Systems and Organs, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, ²State University of Bahia, ³Climério de Oliveira Maternity Hospital, Federal University of Bahia, ⁴Department of Biology, Institute of Biology, Federal University of Bahia, ⁵Department of Pediatrics, School of Medicine of Bahia and Teaching Hospital Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Bahia, Brazil

Correspondence: Prof. Edna
Lúcia Souza,
Santa Luzia Avenue, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia
, Brazil.
E-mail: souza.ednalucia@gmail.com

References

1. Lovett A, Kokta V, Maari C. Diffuse dermatitis: An unexpected initial presentation of cystic fibrosis. *J Am Acad Dermatol* 2008;58:S1-4.
2. O'Regan GM, Canny G, Irvine AD. 'Peeling paint' dermatitis as a presenting sign of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2006;5:257-9.
3. Bernstein ML, McCusker MM, Grant-Kels JM. Cutaneous manifestation of cystic fibrosis. *Pediatr Dermatol* 2008;25:150-7.
4. Darmstadt GL, McGuire J, Ziboh VA. Malnutrition-associated rash of cystic fibrosis. *Pediatr Dermatol* 2000;17:337-47.

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

Access this article online	
Quick Response Code:	Website: www.ijdvl.com
	DOI: 10.4103/ijdvl.IJDVL_616_17

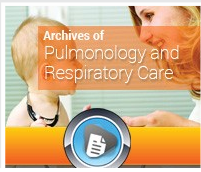
How to cite this article: Bonfim BS, Mota LR, de Godoy Almeida C, de Brito Aguiar AP, de Lima RL, de Mattos ÂP, *et al.* Unusual presentation of cystic fibrosis as diffuse dermatitis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 0;0:0.

Received: September, 2017. **Accepted:** February, 2018.

© 2018 Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology | Published by Wolters Kluwer - Medknow

Apêndice V

Artigo 2 – Original



Clinical Group

Archives of Pulmonology and Respiratory Care

Lais Ribeiro Mota, Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima and Edna Lúcia Souza*

Avenida. Santa Luzia, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brazil

Dates: Received: 16 September, 2017; Accepted: 14 October, 2017; Published: 16 October, 2017

*Corresponding author: Edna Lúcia Santos de Souza, Avenida. Santa Luzia, 379/902, Horto Florestal, Salvador, Bahia, Brazil, CEP: 40.295.050, Tel: +5571 988223326; E-mail: souza.ednalucia@gmail.com; ednalu@ufba.br

<https://www.peertechz.com>

Letter to Editor

The Importance of Genetic Study in Cystic Fibrosis

been made in the search for drugs that may act directly on the molecular defect that causes the disease. There are two types of CFTR modulator treatments (potentiators and correctors) approved for human use by the United States Food and Drug Administration (FDA) and they target the defective transport of ions in their various stages of impairment¹. Potentiators enhance the function of CFTR protein, which is expressed on the plasma membrane (class III to VI mutations), while the correctors improve abnormal CFTR protein that is not expressed in the cell membrane (class I and II mutations).

Ivacaftor is a potentiator, initially studied in patients with the G551D (class III) mutation. The use of this drug in patients with CF demonstrated a reduction in sweat chloride levels while improving FEV₁ and weight gain; In addition, there was a reduction in the number of exacerbations and increase in quality of life [5]. Subsequently, drug indication was broadened to other mutations and more recently its use has been approved for other class III and IV mutations. At this moment ongoing studies are investigating the possible use of Ivacaftor in class II, IV and V mutations [4].

Lumacaftor was the first CFTR-corrector tested in individuals homozygous for the F508del (class II) mutation. The clinical response in these patients was not significant, evidencing that the Lumacaftor was not effective as a single agent. Therefore, the Ivacaftor/Lumacaftor association (potentiator / corrector) was tested in patients with this mutation and demonstrated a reduction in the number of exacerbations, a slight improvement in FEV₁ and quality of life for homozygous patients, but without significant effects on heterozygotes [6]. Since 2015, the use of this combination has been approved by the FDA for F508del homozygous patients.

The onset of CF signs and symptoms may vary, from the first weeks of life to adulthood. Manifestations in pulmonary and gastrointestinal systems, growth retardation and developmental delays, associated with positive sweat chloride tests (above 60 mEq/L), are considered to be classic presentations of the disease [7]. Nonetheless, clinical manifestations may be mild and present only in one organ or system and sweat test might be normal or intermediate (30 to 59 mEq/L), characterizing typical CF [7,8].

Letter to Editor

Cystic fibrosis (CF) is the most common and fatal autosomal recessive genetic disease in euro-descendants. It affects about 85,000 people worldwide [1]. It is characterized by multiple and systemic clinical manifestations that primarily affect exocrine sweat glands, lungs and pancreas while presenting great variability in its severity [2]. It is caused by mutations in the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene* (*CFTR* gene), which encodes the cystic fibrosis transmembrane regulatory protein (CFTR), located on chromosome 7 (locus 7q31), leading to the absence or loss of CFTR function which, under normal conditions, acts as a chloride channel [3].

At present, more than 2,000 *CFTR* gene variants have been identified, of which about 300 have been characterized as definitely pathogenic [4]. Among these, the deletion of 3 base pairs that code for phenylalanine at position 508 (F508del) is the most frequent and can be found in about 80% of patients worldwide, being more common in euro-descendants [1]. Mutations in the *CFTR* gene are categorized into six functional classes according to the change in CFTR protein. In classes I, II and III, there is no protein production, causing a more severe disease pattern, whereas in classes IV, V and VI, the protein produced is defective but remains with some function [2]. However, this classification has been reconsidered and a seventh functional class has been proposed, which would contemplate larger gene deletions [4].

In the last years great progress has been made towards understanding the pathogenesis of CF, leading to the emergence of several therapeutic advances, which include the use of mucolytics, inhaled antimicrobials and systemic anti-inflammatory drugs that play an important role in increasing patients' life quality and expectancy. Likewise, advances have

Moreover, it can occur a monosymptomatic clinical entity (congenital bilateral absence of the vas deferens/pancreatitis/bronchiectasis) associated with CFTR dysfunction that does not fulfill the diagnostic criteria for CF (CFTR-related disorder) [9]. The study of mutations in *CFTR* is of great importance for the diagnosis of these forms of the disease.

The great variability in CF expression among individuals with the same genotypes suggests that in addition to the variation in severity produced by the effects of different mutations and intragenic polymorphisms in the *CFTR* gene, other genetic elements such as polymorphisms in non-*CFTR* genes responsible for the innate response could be modulating the expression of this disease [10]. Recently, studies with modifier candidate genes have been developed trying to associate the relationship between genotype/phenotype variability. Some genes have already been associated with specific clinical manifestations: obstructive pulmonary disease (TGF β 1, MBL2, EHF, APIP, SLC9A3, SLC6A14, MC3R, CASS4, AURKA); intestinal obstruction (MSRA, SLC6A14, SLC9A3); CF-related diabetes (TCF7L2, CDKAL1, CDKN2A / B, IGF2BP2, SLC26A9); infection by *Pseudomonas aeruginosa* (MBL2, DCTN4, SLC6A14); (Chr1p36.1 and Chr5q14) [10]. Also, the environment can be considered a disease modifier [10]. These findings emphasize even more the importance of a personalized medicine for the diagnosis and treatment of CF.

As a result of increased life expectancy many women have reached reproductive age. Men with CF have infertility due to obstructive azoospermia but can also have children with the aid of assisted human reproduction techniques [7]. The risk of a person with CF having affected children depends on their partner, thus in addition to the other benefits of the study of mutations in the *CFTR* gene already described Genetic Counseling (GC) is also of great importance. GC, besides contributing to the understanding of CF and its medical, psychological and family implications, includes the provision of information about the disease (such as estimating the risk of recurrence for future pregnancies in both the couple and other family members), support in accepting the diagnosis and also presents alternatives for prevention (such as pre-implantation diagnosis) [7].

The relevance of the genetic study in CF can be summarized as: a) in patients with established CF diagnosis, for indication of mutation-specific therapy and prognostic determination

(genotype-phenotype correlation), including the study of non-*CFTR* modifying genes; b) investigation of atypical CF forms/CFTR-related disorder; c) GC when one of the spouses has CF or is an asymptomatic *CFTR* mutation carrier and for asymptomatic individuals who are first, second or third degree relatives of affected individuals; d) pre-natal/pre-implantation diagnosis of CF: in future gestation or current gestation, for couples who already have CF children and for heterozygous couples if the test cannot be performed on a child with CF, in embryos of heterozygous couples or when the fetus presents hyperechogenic intestine, dilatation of intestinal loops, growth retardation or overgrowth suggestive of uniparental disomy [7].

References

- Zolin A, van Rens J, Fox A, Iansa P, Prefitsi A, et al. (2010) ECFSPatient Registry Annual Data Report. Karup: European Cystic Fibrosis Society. **Link:** <https://goo.gl/vixn3J>
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic Fibrosis. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors (New York: McGraw-Hill), 5121-80.
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080. **Link:** <https://goo.gl/wM3WZm>
- De Boeck K, Amaral MD (2016) Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 4: 662-674. **Link:** <https://goo.gl/jbkzG4>
- Van Goor R, Yu H, Burton B, Hoffman BJ (2014) Effect of Ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros* 13: 29-36. **Link:** <https://goo.gl/VmdDWH>
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, et al. (2015) Lumacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for phe508del CFTR. *N Engl J Med* 373: 220-231. **Link:** <https://goo.gl/bxfXgU>
- Athanazio RB, da Silva Filho LVRF, Vergara AA, Ribeiro AF, Riedi CA, et al. (2017) Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. *J Bras Pneumol* 43: 219-245. **Link:** <https://goo.gl/wZMSMe>
- Schram CA (2012) Atypical cystic fibrosis: identification in the primary care setting. *Can Fam Physician* 58: 1341-1345. **Link:** <https://goo.gl/8Fo89W>
- Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso R, et al. (2017) Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 181S: S4-15. **Link:** <https://goo.gl/Wmtv2A>
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16: 45-56. **Link:** <https://goo.gl/ijhPcj>

Apêndice VI

Artigo 1 – Original

Manifestações clínicas da mutação F508del: uma série de casos de pacientes com fibrose cística

Clinical manifestation of F508del mutation: a case series report of cystic fibrosis patients

Laís Ribeiro Mota¹, Maria Betânia Pereira Toralles^{2*}, Edna Lucia Souza³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA.; ²Doutora em Medicina e Saúde, Professora Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA.; ³Doutora em Medicina e Saúde, Professora Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA.

RESUMO

Introdução: a Fibrose Cística (FC) é doença autossômica recessiva mais comum e letal na população de origem caucasóide. Causada por mutações no gene que codifica a proteína CFTR, no qual já existem mais de 2.000 mutações identificadas, sendo a mutação F508del a mais frequente. Esta doença apresenta-se de forma multissistêmica com quadro clínico altamente variado e com considerável diversidade na gravidade e na progressão da doença. Alguns estudos correlacionam os sintomas a genótipos de pacientes.

Objetivo: descrever o genótipo e a apresentação clínica dos pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para esta mutação F508del. **Metodologia:** foi realizada a descrição de uma série de casos de pacientes diagnosticados com FC que apresentam a mutação F508del, acompanhados pelo Ambulatório Multidisciplinar de FC do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos do Estado da Bahia. **Resultados:** Dez (45,4%) crianças eram homocigotas para a mutação e 12/22 (54,5%) heterocigotas compostas. As principais manifestações clínicas que levaram ao diagnóstico foram: insuficiência pancreática (95,4%), sintomas respiratórios (85,2%), dificuldade em ganhar peso (88,5%), esteatorreia (73,3%), eritemo intestinal alterado (53,8%). A idade de início dos sintomas (mediana 0,16 anos) e do diagnóstico (mediana 0,58 anos) foram precoces, refletindo a gravidade da doença. **Conclusões:** Concluiu-se que as características clínicas laboratoriais dos pacientes descritos foram semelhantes aos relatados na literatura e destacam a associação entre insuficiência pancreática e genótipos de pacientes, enfatizando a importância do estudo genético na determinação do prognóstico dos pacientes, e especialmente na população de alta prevalência, como no Brasil.

Descritores: Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística. Mutações. Genótipo.

Abstract

Introduction: cystic fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disorder in Caucasian populations and occurs as a result of mutations in the CFTR gene, which codifies the transmembrane protein known as CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Currently, more than 2,000 mutations have been described and the F508del mutation is the most frequent among patients with CF. This is a multisystemic disease with wide variability in clinical manifestations and in severity and disease progression. Some studies correlate the genotypes with symptoms in CF patients. **Objectives:** to describe the genotypes and clinical manifestations for the F508del mutation in patients who are homozygous or heterozygous. **Methods:** it was a case series report of CF patients followed in a multidisciplinary clinic at The Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos in the State of Bahia. **Results:** for the F508del mutation, ten (45.4%) children were homozygous and 12/22 (54.5%) heterozygous. The main clinical manifestations during diagnosis were: pancreatic insufficiency (95.4%), respiratory symptoms (86.9%), weight gain difficulty (85.8%) and steatorrhea (77.5%). The median age of first symptoms (0.16 years) and at diagnosis (0.56 years) was early, which highlights the disease severity. **Conclusions:** the clinical manifestations were similar to those described in the literature and highlight the association between pancreatic insufficiency and patients' genotypes, as well as emphasize the importance of a genetic study in the disease prognosis, particularly in high admixture populations in Brazil.

Keywords: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Mutations. Genotype.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC; OMIM219700) ou Mucoviscidose é doença autossômica recessiva mais frequente

na população, sendo mais comum naqueles de origem caucasóide, apresentando-se como uma enfermidade multissistêmica¹. O gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossomo 7 (*locus* 7q31), é responsável pela codificação da proteína CFTR que atua como um canal de cloro. Mutações neste gene resultam na ausência ou função defeituosa da

Correspondente/Corresponding: *Maria Betânia Pereira Toralles – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. – Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Valedo Canela, Salvador – BA. CEP: 40110-100 – Tel: (71) 99965-9211 – E-mail: m.toralles@uol.com.br

proteína CFTR^{2,3,4}. Estima-se que haja atualmente cerca de 70.000 afetados por esta doença, em todo o mundo⁵. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, existem, aproximadamente, 4 mil indivíduos acometidos pela FC⁶, com uma incidência próxima de 1:7000 nascidos vivos, sendo variável de acordo com a região geográfica⁷. Existem mais de 2.000 mutações identificadas no gene CFTR⁸, as quais são classificadas em seis grupos tendo como base a funcionalidade da proteína, onde nas classes I, II e III não há síntese da proteína CFTR, o que acarreta maior gravidade clínica do que a observada nas classes IV, V e VI, onde há produção de uma CFTR defeituosa¹. A primeira mutação identificada e, também, a mais frequente mundialmente é a F508del, presente em cerca de 70% dos casos de FC, dependendo da população analisada, variando de 26% na Turquia até 88% na Dinamarca⁸. Esta é uma mutação da classe II e ocorre devido à deleção de três pares de bases no éxon 10, resultando na perda do aminoácido fenilalanina na posição 508, ocasionando o dobramento errôneo da CFTR e, posteriormente, sua degradação no retículo endoplasmático rugoso⁹. Em países economicamente desenvolvidos existem muitas bem definidas e possíveis de identificar mais facilmente todas as mutações presentes no gene CFTR dos pacientes, porém, em populações em desenvolvimento e/ou miscigenadas como a brasileira a caracterização genotípica é mais complexa. No Brasil, a frequência média da F508del é 50%, variando de 8,7% a 50%^{10,11,12,13,14,15,16,17}, a depender da região avaliada. Segundo IBGE¹⁸, no Estado da Bahia 80% dos habitantes são afrodescendentes, apresentando altas taxas de miscigenação, especialmente entre descendentes de europeus e africanos. Apenas dois estudos pesquisaram a mutação F508del em pacientes fibrocísticos baianos. Costa et al.¹⁰ encontraram frequência alélica de 8,7%, enquanto Mota¹³ encontrou 25,5%. A FC apresenta-se como uma enfermidade multissistêmica com quadro clínico altamente variado e os pacientes são diagnosticados com considerável diversidade na gravidade e na progressão da doença¹⁹. Alguns estudos vêm tentando relacionar os sintomas a genótipos dos pacientes, porém uma importante variabilidade fenotípica é observada entre pacientes da mesma classificação mutacional e, até mesmo, entre pacientes que apresentam a mesma mutação²⁰. Devido à alta frequência e gravidade clínica associada à mutação F508del, o objetivo deste estudo foi descrever o genótipo e a apresentação clínica dos pacientes homocigotos ou heterocigotos compostos para esta mutação acompanhados pelo Ambulatório Multidisciplinar de FC do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos do Estado da Bahia.

METODOLOGIA

Modelo do estudo

Trata-se de uma série de casos de pacientes diagnosticados com FC que apresentam a mutação F508del,

oriundo de um estudo de coorte que acompanha indivíduos de 0–20 anos atendidos no AMFC desde 2008.

Pacientes

Os pacientes do estudo receberam diagnóstico clínico de Fibrose Cística de acordo com os critérios da *Cystic Fibrosis Foundation*⁵. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, sob o número 121/2011. Os pais e/ou responsáveis de todas as crianças incluídas no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a admissão dos pacientes no estudo, foi aplicado um formulário padrão, de onde foram obtidas informações clínico-epidemiológicas. Os pacientes realizaram coleta de uma amostra de sangue periférico para a análise da mutação F508del, através da reação em cadeia de polimerase PCR. Adicionalmente, as mutações G542X e 3120+1G>A foram pesquisadas de acordo com as técnicas específicas.

Variáveis clínico/demográficas

Foram estudadas as seguintes variáveis clínico/demográficas: idade dos pacientes na admissão do estudo de coorte, no início dos sintomas e ao diagnóstico, grupo racial, consanguinidade entre os pais, sintomas respiratórios, história de íleo meconial, esteatorreia, insuficiência pancreática (identificada através da pesquisa da elastase fecal), dificuldade em ganhar peso no momento do diagnóstico, uso de enzimas pancreáticas e os níveis de cloro no suor.

Análise dos Dados

Os dados obtidos foram registrados e armazenados em um banco de dados utilizando o programa Epidata. A análise descritiva incluiu cálculos de médias, medianas e frequências simples e relativas das variáveis estudadas.

RESULTADOS

Características da População de Estudo

Cinquenta e três pacientes foram incluídos no estudo de coorte até o presente. Destes, 22 (41,5%) apresentaram a mutação F508del e tinham dois testes de suores que os níveis de cloro foram elevados (≥ 60 mmol/L). Treze dos 22 (59%) eram do sexo masculino. De acordo com as características fenotípicas da criança e/ou dos pais, todos os pacientes foram classificados como não brancos (miscigenados).

Análise da mutação F508del

Dez (45,4%) crianças eram homocigotos para a mutação e 12/22 (54,5%) heterocigotos compostos, estes foram subdivididos em indivíduos heterocigotos com as duas mutações caracterizadas e heterocigotos compostos com apenas a mutação F508del identificada até o momento. A Tabela 1 descreve o genótipo e as variáveis clínicas dos pacientes.

Tabela1—Genótipo e variáveis clínicas dos 22 pacientes com mutação F508del acompanhados pelo AMFC em Salvador, 2012 a 2016

Genótipos	N (%)	Classe Mutacional	Mediana de idade (anos) no início dos sintomas IIQ (Min-Max)	Mediana de idade (anos) no momento do diagnóstico IIQ (Min-Max)
F508del/F508del	10 (45,4%)	II	0,08 (0,08-7)	0,58 (0,25-10)
F508del/G542X	1 (4,5%)	II/I	0,16 (0,08-2)	0,5 (0,08-4,9)
F508del/3120+1G→A	6 (27,4%)	II/I		
F508del/?	5 (22,7%)	II/?	0,25 (0,08-2)	4,75 (0,5-15,8)

IIQ: intervalo interquartil; Min: mínima; Max: máxima.

Características clínico-demográficas da população estudada

A mediana de idade (em anos) dos pacientes no início dos sintomas no momento do diagnóstico foram, respectivamente, 0,16 (0,08–7) e 0,7 (0,08–15,8). A Tabela 2 compara os principais sintomas que levaram ao diagnóstico dos pacientes homocigotos e heterocigotos compostos para a mutação F508del. As principais manifestações clínicas registradas foram: insuficiência pancreática observada com base em seus dados clínicos e/ou confirmação laboratorial (95,4%), dificuldade em ganhar peso (88,5%), sintomas respiratórios (85,2%),

esteatorreia (73,3%) e ritmo intestinal alterado (53,8%). Nenhum dos 22 pacientes tinha histórico de íleo mecânico. Havia história de consanguinidade entre os pais de dois (2/22) pacientes homocigotos (9%), para a mutação F508del entre seis pacientes (primos e irmãos): três (F508del/F508del) e três (F508del/3120+1G→A). Entre os 22 pacientes estudados apenas um paciente não teve evidências clínicas nem confirmação de insuficiência pancreática (IP) e não fez uso de enzimas pancreáticas. Vinte e um crianças continuaram sendo acompanhadas e um paciente homocigoto foi obito por desidratação antes do segundo ano de vida.

Tabela2—Principais sintomas apresentados pelos pacientes com mutação F508del que levaram ao diagnóstico da Fibrose Cística no AMFC em Salvador, 2012 a 2016

Sintomas	Homocigotos F508del	Heterocigotos com a 2ª mutação identificada	Heterocigotos compostos com a 2ª mutação não identificada
Sintomas respiratórios	9/10 (90%)	6/7 (85,7%)	4/5 (80%)
Dificuldade ganho peso	8/10 (80%)	6/7 (85,7%)	5/5 (100%)
Esteatorreia	8/10 (80%)	7/7 (100%)	2/5 (40%)
Insuficiência Pancreática	7/7 (100%)*	7/7 (100%)	4/5 (80%)
Ritmo Intestinal Alterado	7/10 (70%)	5/7 (71,4%)	1/5 (20%)

*3 pacientes não realizaram.

DISCUSSÃO

Além da mutação F508del, os pacientes foram investigados para as mutações: G542X e 3120+1G→A. A F508del é a mutação mais frequente no gene *CFTR*, tendo surgido originalmente, na Europa 52 mil anos atrás, sendo assim considerada um marcador genético de ascendência europeia²¹. A G542X é a segunda mutação mundialmente mais frequente, ocorre pela substituição de um aminoácido Glicina por um códon de parada no códon 542 do exão 11 e é frequente na população espanhola^{22,23}. A 3120+1G→A, é uma mutação de *splicing* que leva ao processamento incorreto do RNA no intron 16⁸, sendo a segunda mais prevalente em americanos afrodescendentes, perdendo em frequência apenas da F508del²⁴. Dörk et al.²⁵ encontraram haplótipos idênticos do *CFTR* para os alelos 3120+1G→A entre os africanos, árabes e afroamericanos, sugerindo que a mutação possui origem ancestral comum. Estes pesquisadores chegaram à conclusão que essa mutação é muito antiga e deve ser mais comum do que se imaginava em populações de áreas tropicais e

sub-tropicais, onde a FC ainda é subdiagnosticada, como o Brasil. A presença de estas três mutações nos pacientes estudados reforça a alta miscigenação da população brasileira, especialmente a baiana, que apresenta uma grande contribuição de imigrantes europeus, principalmente portugueses, espanhóis e italianos, na constituição da população, levando a uma grande variedade étnica nesse estado²⁶. Raskin et al.²⁷ sugerem que mesmo os brasileiros que são fenotipicamente não-brancos na aparência e se consideram de origem não-europeia não podem ser completamente livres de miscigenação europeia e vice-versa, o que pode ser constatado neste estudo, onde pacientes não brancos com franca ascendência africana tiveram a mutação F508del identificada. Entretanto, foi extremamente difícil classificar a raça no presente estudo, uma vez que existe um alto grau de miscigenação nessa população, sendo esperada uma grande variabilidade genotípica nestes pacientes com consequente heterogeneidade clínica da doença.

É importante ressaltar que os pacientes estudados apresentaram início muito precoce dos sintomas (mediana 0,16 anos). Dez (45%) crianças tinham sintomas desde o primeiro mês de vida e apenas 4 (18%) apresentaram manifestações clínicas a partir dos 2 anos de idade, o que deve refletir a gravidade da doença. Alvarez et al.²⁸ encontraram grande variação de idade do início dos sintomas desde o nascimento até 20 anos, com mediana de 3 meses em pacientes do sudeste brasileiro. No presente estudo, a mediana de idade dos pacientes no diagnóstico foi 0,58 anos (variando desde um mês até 15 anos), sendo que o tempo mediano entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 5 meses. A mediana (p25-p75) de idade em anos 0,58 (0,31-5,6) no momento do diagnóstico foi inferior àquela do Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2013 (REBRAFC)²⁹, em que a mediana (p25-p75) foi 1,47 anos (0,25-7,35), e a próxima - sedo registro americano⁵, onde a mediana de idade dos pacientes foi em meses. A semelhança entre estes dados deve, possivelmente, por este estudo analisar apenas pacientes com ao menos uma mutação de classe grave, onde os quadros clássicos da doença são comuns, contribuindo para um diagnóstico mais precoce. Bem como, pela alta frequência, próxima de 70%, da mutação F508 del nos pacientes fibrocísticos daquele país³⁰.

A mediana de início dos sintomas foi menor nos pacientes homocigotos quando comparados aos heterocigotos e, também, nos pacientes heterocigotos com as duas mutações identificadas em comparação aos heterocigotos compostos com apenas a mutação F508 del identificada. É possível que a segunda mutação ainda desconhecida neste subgrupo seja de uma classe funcional de menor gravidade, levando a doença mais branda, com consequente início dos sintomas e diagnóstico mais tardios. As principais manifestações clínicas apresentadas pelos 22 pacientes estudados estão próximas das que foram observadas em outros trabalhos nacionais e internacionais. Alvarez et al.²⁸ encontraram as manifestações respiratórias e digestivas em 89,4% e 59,6% dos pacientes, respectivamente, como principais sintomas que levaram a diagnóstico na Região Sudeste Brasileira. No presente estudo, a insuficiência pancreática e ritmo intestinal alterado foram observados, respectivamente, em 95,4% e 53,8% dos casos. Gibson et al.³¹, relataram que na maioria dos casos de fibrose cística nos Estados Unidos, o diagnóstico foi baseado nos sintomas respiratórios (43,8%), atraso no crescimento (29,3%), esteatorreia (24,4%) e íleo mecônio (18,5%). No presente estudo, os sintomas respiratórios, dificuldade em ganhar peso e esteatorreia foram sintomas comuns, ocorrendo respectivamente em 85,2%, 88,5%, 73,3% dos pacientes. Não houve relato de íleo mecônio em nenhum paciente neste estudo. O genótipo do *CFTR* também está associado ao transporte iônico através do epitélio intestinal, porém sua correlação com o desenvolvimento de complicações intestinais, como o íleo mecônio, em pacientes com FC ainda é pouco clara³².

A insuficiência pancreática foi observada em 21/22 (95,5%) dos pacientes, e apenas um paciente heterocigoto composto com a segunda mutação não identificada possui insuficiência pancreática, semelhante à literatura, onde King et al.³³ encontraram esse sintoma em 88% dos indivíduos analisados. A função pancreática na FC é altamente associada ao genótipo apresentado. Pacientes com insuficiência pancreática têm pelo menos uma mutação moderada, enquanto pacientes com insuficiência pancreática são geralmente homocigotos ou heterocigotos compostos para duas mutações de efeito grave, apresentando sintomas da FC clássica³², como observado no presente estudo. Corroborando com a literatura, Kerem et al.³⁴ encontraram esta característica, à época do diagnóstico, em 99% dos pacientes homocigotos para a mutação F508 del, em 72% dos heterocigotos compostos, e em apenas 36% dos pacientes com outras mutações. Estes autores observaram, também, que os pacientes com essa mutação foram diagnosticados em uma idade mais precoce. A doença hepática está altamente associada com a função pancreática e, em alguns casos, com íleo mecônio. Destemodo, pacientes com doença hepática tendem a apresentar mutações de efeito grave, que estão altamente associadas à insuficiência pancreática³². Conclusões: Apesar das limitações, inerentes ao modelo do estudo, conclui-se que as características clínicas e laboratoriais dos 22 pacientes fibrocísticos com a mutação F508 del foram semelhantes às descritas na literatura. Entretanto, a ausência de íleo mecônio foi marcante neste trabalho. Estes resultados também permitem corroborar a literatura que destaca a associação entre insuficiência pancreática e o genótipo dos pacientes e enfatizam a importância do estudo genético na determinação do prognóstico dos pacientes, em especial em populações altamente miscigenadas como o Brasil.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos pacientes com fibrose cística e suas famílias por permitir que este estudo fosse realizado. Além disso, eles são gratos aos profissionais do ambulatório multidisciplinar do Hospital da Universidade Federal da Bahia pela prestação de assistência aos pacientes, a professora Renata Lúcia Ferreira de Lima e a graduanda Paloma Horejs Bittencourt pela ajuda durante a realização dos testes moleculares e preparação do presente manuscrito. Financiamento parcial FAPESB.

REFERÊNCIAS

1. WELSH, M. J. et al. **The metabolic and molecular bases of inherited diseases**. New York: McGraw-Hill, 2001.
2. KEREM, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1073-1080, Sept. 1989.
3. RIORDAN, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1066-1073, Sept. 1989.
4. ROMMENS, J. M. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. **Science**, Washington, v.245, n.4922, p.1059-1065, Sept. 1989.

5. CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. 2015. Disponível em: <www.cff.org>. Acesso em: 04 jul. 2016.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 338 de 29 de junho de 2005. Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2005/PT-338.htm>. Acesso em: 11 jul. 2016.
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis**. 2004. Disponível em: <http://www.cffw.org/docs/who/2002/who_hgn_cf_wg_04.02.pdf>. Disponível em: <http://www.who.int/genomics/publications>. Acesso em: 17 jul. 2016.
8. CYSTIC Fibrosis Mutation Database. Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>. Acesso em: 25 jul. 2016.
9. KO, Y.H. et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 32, p. 24330-24338, 1993.
10. COSTA, F.M.M. et al. Low frequency of the delta AF508 mutation of the CFTR gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 79, n. 3, p. 293-297, 2007.
11. VIDIGAL, P.V.T. et al. ΔF508 delin a heterogeneously cystic fibrosis population from Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 8, p. 643-647, 2008.
12. CABELLO, G.M.K. et al. The 3120+1G→A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian. **Hum. Biol.**, Detroit, v. 73, n. 3, p. 403-409, 2001.
13. MOTA, L.R. **Estudo de mutações no gene CFTR em pacientes com fibrose cística de um centro universitário de referência em Salvador-BA**. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Biodiversidade) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
14. BIEGER, A.M.; MARSON, F.A.L.; BERTUZZO, C.S. Prevalence of ΔF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 6, p. 531-534, 2012.
15. OKAY, T.S. et al. Frequency of the ΔF508 mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. **Clinics**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 131-134, 2005.
16. PERONE, C. et al. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 2, p. 134-138, 2010.
17. COUTINHO, C.A.A.C. et al. Mutações no gene cystic fibrosis transmembrane conductance regulator em um centro de referência para a fibrose cística. **J. Bras. Pneumol.**, v. 39, n. 5, p. 555-561, 2013.
18. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 14 maio 2016.
19. MISHRA, A.; GREAVES, R.; MASSIE, J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. **Clin. Biochem. Rev.**, Melbourne, v. 26, n. 4, p. 135-153, 2005.
20. SLIEKER, M.G. et al. Disease modifying genes in cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, Utrecht, v. 4, supl. 2, p. 7-13, 2005.
21. DAWSON, K.P.; FROSSARD, P.M. The geographic distribution of cystic fibrosis mutations gives clues about population origins. **Eur. J. Pediatr.**, Heidelberg, v. 159, n. 7, p. 496-499, jul. 2000.
22. ZIELENSKI, J.; TSUI, L.P. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. **Ann. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 29, p. 777-807, 1995.
23. LUCA, G.R. de; MENEZES, M.A.; CAMPOS, M.O. Genética e diagnóstico molecular. In: LUDWIG NETO, N. **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. Florianópolis: Secretária de Estado de Saúde, 2008.
24. MACEK JUNIOR, M. et al. Identification of common cystic fibrosis mutations in African-Americans with cystic fibrosis increases the detection rate to 75%. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 1122-1127, May 1997.
25. DÖRK, T. et al. Evidence for a common ethnic origin of cystic fibrosis mutation 3120+1G-to-A in diverse populations. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 656-662, 1998.
26. TAVARES, L.H.D. **História da Bahia**. 8. ed. São Paulo: Ática, 1987. 260p.
27. RASKIN, S. et al. High allelic heterogeneity between African-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. **Genet. Test.**, New York, v. 7, n. 3, p. 213-218, 2003.
28. ALVAREZ, A.E. et al. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 371-379, 2004.
29. REGISTRO BRASILEIRO DE FIBROSECÍSTICA (REBRAFC). 2013. Disponível em: <http://www.gbefc.org.br/gbefc/Registro2013_Portugues_site.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2016.
30. BOBADILLA, J.L. et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations – correlation with incidence data and application to screening. **Hum. Mutat.**, New York, v. 19, n. 6, p. 575-606, June 2002.
31. GIBSON, R.L.; BURNS, J.L.; RAMSEY, B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 168, n. 8, p. 918-951, 2003.
32. CUTTING, G.R. Modifier genetics: cystic fibrosis. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, Palo Alto, v. 6, p. 237-260, 2005.
33. KING, S.J. et al. Reduced bone density in cystic fibrosis: ΔF508 mutation is an independent risk factor. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 54-61, 2005.
34. KEREM, B. et al. Identification of mutations in regions corresponding to the 2 putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Estados Unidos, v. 87, n. 81, p. 8447-8451, 1990.

Submetido em: 07/10/2016

Aceito em: 09/11/2016

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: 8

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: 3.456.100

Apresentação do Projeto:

Trata-se de respostas as pendências mantidas ou parcialmente atendidas em parecer anterior numero 3.246.988/2019.

Os itens apontados são detalhados no item conclusões.

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer prévio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer prévio.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide parecer prévio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi acrescentado o termo de Compromisso do Investigador Lucas da Silva Vieira.

Recomendações:

Vide conclusões.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-060

UF: BA

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



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Seguem pendências elencadas em parecer anterior, as respostas dos pesquisadores e a avaliação do parecerista:

1) A regularização do Biorrepositório requer "regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano" (item 2.IV. CNS 441/2011). NÃO FOI IDENTIFICADO ESTE DOCUMENTO DENTRE OS ANEXADOS NA PLATAFORMA BRASIL, dado que os pesquisadores não anexaram documento que comprove "regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano".

RESPOSTA: Foi anexado o arquivo intitulado "Documento_biorrepositorio_preenchido.pdf". Informa, este documento, vigência do biorrepositório entre Agosto de 2012 a Dezembro de 2020, sob a responsabilidade da pesquisadora gestora Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima, Universidade Federal da Bahia, tendo como produto de armazenamento DNA humano em três alíquotas por participante, em freezer a -20°C por 10 anos.

CONCLUSÃO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2) Conforme item IV.5.d da Resolução CNS 466/2012, o TCLE deve "ser elaborado em duas VIAS, RUBRICADAS (PENDÊNCIA) em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participardapesquisa,ouporseurepresentantelegal,assimcomopelopesquisadorresponsável,ouela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. SOLICITA-SE ADEQUAÇÃO. INFORMAR NO TCLE A NECESSIDADE DE RUBRICAR TODAS AS PAGINAS;

RESPOSTA: FOI A CRESCIDO O TRECHO "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 TCLE e o trecho "Você receberá uma via assinada e rubricada em suas páginas deste assentimento" no TALE.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/n° - 1º Andar

Bairro: Canela

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-060

UF: BA

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



Continuação do Parecer: 3.456.100

CONCLUSÃO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3) No TCLE, "Em ambas as vias deverão CONSTAR O ENDEREÇO (PENDÊNCIA) e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local e da CONEP, quando pertinente. SOLICITA-SE ADEQUAÇÃO;

RESPOSTA: FOI ACRESCENTADO O ENDEREÇO DO CEP NO TCLE e no TALE.

CONCLUSÃO: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4) Diante da possibilidade de participação de adolescentes, um termo de Assentimento deve ser elaborado e submetido a apreciação do Sistema CEP/CONEP. Termo de Assentimento é definido como "documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou para os legalmente incapazes, por meio do qual, após os participantes da pesquisa serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais". Os pesquisadores incluiria, em parecer anterior, O ARQUIVO INTITULADO TCLE_MENORES_2019 mas com O MESMO CONTEÚDO DO TCLE_MAIORES_2019.PDF. Foi solicitado O TERMO DE ASSENTIMENTO CORRETO PARA ANÁLISE.

RESPOSTA: Foi acrescentado um TALE universal, arquivo TALE_2019.pdf. O mesmo está bem completo e com linguagem mais clara e direta, porém ainda de difícil entendimento para uma criança abaixo de 10 anos. Considerando que a resolução CNS 466/2012 não é clara em informar a partir de que idade o TALE deve ser aplicado, esse parecerista considera fundamental a necessidade de que o adolescente tenha seu assentimento solicitado. Para tal fim, considero o termo adequado.

Conclusão: PENDÊNCIA ATENDIDA.

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

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-060

UF: BA

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 03 de 07

ANEXOS

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



Continuação do Parecer: 3.456.100

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 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:

Emenda Aprovada

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Auto r	Situaçã o
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES_BASICAS_1276560_E4.pdf	05/06/2019 22:06:08		Aceito
Outros	Documento_biorrepositorio_preenchido.pdf	05/06/2019 22:05:06	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_unificado_maiores.pdf Endereço: Rua Augusto Vasconcelos, s/nº - 1º Andar Bairro: Canaleta Município: SALVADOR CEP: 40.110-060 UF: BA Telefone: (71)3283-8048 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com	05/06/2019 22:03:03	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Resposta_pendências_2.pdf	05/06/2019	Edna Souza	Aceito

Página 04 de 07

ANEXOS

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



Continuação do Parecer: 3.456.100

Assentimento / Justificativa de Ausência	Resposta_pendencias_2.pdf	22:02:01	Edna Souza	Aceito
Outros	Termo_compromisso_Lucas.pdf	05/06/2019 22:00:08	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_unificado_menores.pdf	05/06/2019 21:59:49	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_2019.pdf	05/06/2019 21:56:14	Edna Souza	Aceito
Outros	Resposta_pendencias.pdf	28/02/2019 22:54:32	Edna Souza	Aceito
Outros	emenda_2018_2.pdf	13/12/2018 21:15:29	Edna Souza	Aceito
Outros	emenda2018.pdf	05/10/2018 15:35:04	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoMurilo.pdf	04/10/2018 21:50:02	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoMarilia.pdf	04/10/2018 21:49:30	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoLaryssa.pdf	04/10/2018 21:49:00	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoHortencia.pdf	04/10/2018 21:48:31	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoFernandaC.pdf	04/10/2018 21:48:04	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoAdson.pdf	04/10/2018 21:47:40	Edna Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoFiocruz.pdf	04/10/2018 21:47:25	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoAdriana.pdf	04/10/2018 21:46:55	Edna Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_2018.pdf Endereço: Rua Augusto Vasconcelos, s/nº - 1º Andar Bairro: Canela UF: BA Telefone: (71)3283-8043 Município: SALVADOR CEP: 40.110-060 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com	04/10/2018 21:22:15	Edna Souza	Aceito

Página 05 de 07

ANEXOS

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



Cronograma Continuação do Parecer: 3.456.100	CRONOGRAMA.pdf	29/08/2017 10:58:16	Edna Souza	Aceito
Outros	resposta.pdf	29/08/2017 10:56:26	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLEAdicional.pdf	13/07/2017 11:46:25	Edna Souza	Aceito

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar

Bairro: Canela

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-060

UF: BA

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



Continuação do Parecer: 3.456.100

Justificativa de Ausência	TCLEAdicional.pdf	13/07/2017 11:46:25	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoTatiane.pdf	13/07/2017 11:46:10	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoJamile.pdf	13/07/2017 11:45:57	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoGabriela2.pdf	13/07/2017 11:45:44	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoGabriela.pdf	13/07/2017 11:45:14	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoFernanda.pdf	13/07/2017 11:45:00	Edna Souza	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoCintia.pdf	13/07/2017 11:44:45	Edna Souza	Aceito
Outros	FernandaFontenelle.pdf	13/07/2017 11:42:43	Edna Souza	Aceito
Outros	Emenda2017.pdf	13/07/2017 11:42:02	Edna Souza	Aceito
Outros	TatianeFerreira.pdf	13/07/2017 11:41:41	Edna Souza	Aceito
Outros	JamileBomfim.pdf	13/07/2017 11:41:18	Edna Souza	Aceito
Outros	GabrielaCosta.pdf	13/07/2017 11:40:35	Edna Souza	Aceito
Outros	CintiaKarla.pdf	13/07/2017 11:39:07	Edna Souza	Aceito
Outros	Emendaadendo.pdf	21/10/2016 00:43:45	Edna Souza	Aceito
Outros	Anexo.pdf	20/10/2016 23:37:24	Edna Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/10/2016 23:30:58	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

Endereço: Rua Augusto Viana, s/n° - 1° Andar

Bairro: Canela

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-060

UF: BA

Telefone: (71)3283-8043

Fax: (71)3283-8140

E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 06 de 07

ANEXOS

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



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, 16 de Julho de 2019

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

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: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

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