

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**BIOMODULADORES DA PROTEÍNA CFTR E A MORBIDADE POR DOENÇA
RESPIRATÓRIA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA NO ESTADO DO
PARÁ**

Valéria de Carvalho Martins

Porto Alegre, maio de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**BIOMODULADORES DA PROTEÍNA CFTR E A MORBIDADE POR DOENÇA
RESPIRATÓRIA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA NO ESTADO DO
PARÁ**

Valéria de Carvalho Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas/DINTER, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Orientador: Profa. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Porto Alegre, maio de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho Martins, Valéria
Biomoduladores da Proteína CFTR e a Morbidade por
Doença Respiratória em Pacientes com Fibrose Cística do
Estado do Pará / Valéria Carvalho Martins. -- 2014.
120 f.

Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, RR-RS, 2014.

1. Fibrose Cística. 2. Biomoduladores da Proteína
CFTR. 3. Morbidade por doença respiratória em fibrose
cística. 4. genética em fibrose cística. I. Doederlein
Schwartz, Ida Vanessa , orient. II. Título.

**Ao meu querido pai,
In memoriam**

Agradecimentos

- À profa. Ida minha orientadora por ter aceitado mais este desafio.
- À querida Vera pela atenção e carinho sempre dispensados, contribuindo de forma incansável em todas as etapas desta empreitada.
- Ao Prof. Wolnei Caumo pela grande oportunidade.
- À profa. Ândrea e Milene do LGM-UFGA que me acolheram e acompanharam as etapas mais complexas do estudo sempre atentas à qualidade do estudo
- À profa. Luciana, que me iluminou no escuro caminho da análise estatística.
- Aos novos amigos que adquiri nestes quatro anos, com alguns dividi morada e muito carinho, com outros, caminhadas e devaneios e por fim aqueles que entraram de coração para um novo convívio.
- Aos meus queridos marido e filhos, pelo constante calor do convívio, pelo estímulo e pela tolerância, em especial á minha Beatriz que fez mágica nesta edição.
- À minha mãe e irmãos sempre tão generosos e atentos às minhas conquistas
- Aos meus amigos que me presenteiam com o eterno carinho.
- E por fim, a todos os meus pacientes do HUUJBB, que pelo respeito e confiança se convidaram a participar do estudo. Sem eles nada disso seria possível.
- Enfim, a todos que em algum momento estiveram presentes, ficaram as saudades dos momentos de muita reflexão na nave “*Dinter’s Interprise*”!

“Pasma sempre quando acabo qualquer coisa. Pasma e desolo-me. O meu instinto de perfeição deveria inibir-me de acabar, deveria inibir-me até de dar o começo. Mas distraio-me e faço. O que consigo é um produto, em mim, não de uma aplicação de vontade, mas de uma cedência dela. Começo porque não tenho força para pensar; acabo porque não tenho alma para suspender”.

Fernando Pessoa

Resumo

A Fibrose cística é uma doença autossômica recessiva que tipicamente se manifesta por doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência exócrina do pâncreas e elevada concentração de eletrólitos no suor. É causada por mutações no gene Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (*CFTR*). A disfunção da *CFTR* causa obstrução principalmente das vias aéreas e dos ductos pancreáticos. O curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão sempre diretamente relacionados ao genótipo específico da *CFTR*, sugerindo uma forte ação de genes modificadores ou de variantes intragênicas, que podem influenciar na gravidade do fenótipo associado. **Objetivo:** Este estudo propôs caracterizar clínica e geneticamente uma amostra de pacientes com fibrose cística no Hospital Universitário João de Barros Barreto (Pará, Brasil) e estabelecer uma possível associação da variante p.M470V com a gravidade da doença respiratória. **Metodologia:** Um questionário clínico e epidemiológico foi aplicado para coleta de dados dos pacientes em dois momentos distintos. O DNA foi extraído e realizado seqüenciamento direto dos éxons: 11, 12, 18, 19, 21 e 22 utilizando sequenciador automático ABI Prism – 3130 (Applied Biosystems). **Resultados:** Foram coletados dados clínicos de 135 pacientes, porém o estudo genético só foi possível em 125 destes. A média de idade dos pacientes estudados foi de $15,44 \pm 11,8$ anos (mediana: 13 anos) e ao diagnóstico foi de $10,00 \pm 9,6$ anos (mediana: 7 anos), onde 56,3% eram do sexo masculino e 82,2% pardos. Ao diagnóstico 94,8% dos pacientes eram sintomáticos: respiratórios (92,6%), digestivos (34,9%) e 32,6% desnutridos. *Pseudomonas aeruginosa* (37,4%) e *Staphylococcus aureus* (49,63%) foram os microorganismos mais frequentes do trato respiratório. O éxon 11 foi o que apresentou uma maior prevalência de alterações patogênicas e não patogênicas. A frequência alélica da mutação p.F508del foi 14,8% e da p.M470V foi 56,4%. O estudo não demonstrou associação de p.M470V isoladamente com gravidade de doença respiratória, porém a mutação p.F508del mostrou associação com pior evolução radiológica e infecção por *P aeruginosa*. **Conclusão:** O estudo revelou um diagnóstico tardio nesta amostra, e não esclareceu o papel da variante p.M470V na evolução da doença respiratória da FC.

Palavras chave: *CFTR*, fibrose cística, mutações, variantes

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease that typically manifests as chronic obstructive pulmonary disease, exocrine pancreatic insufficiency, and a high concentration of electrolytes in sweat caused by mutations in the gene Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (*CFTR*). The dysfunction of *CFTR* causes obstruction, especially of the airways and pancreatic ducts. The course and severity of pulmonary manifestations are not always directly related to the specific *CFTR* genotype, suggesting a strong action of modifying genes and of intragenic variants, which may influence the severity of the associated phenotype. **Objective:** This study aimed to clinically and genetically characterize a sample of patients with cystic fibrosis in the Hospital Universitário João de Barros Barreto (Pará, Brazil) and establish a possible association of the variant p.M470V with the severity of respiratory disease. **Methods:** A clinical and epidemiological questionnaire was applied to collect data from patients two different times. DNA was extracted and direct sequencing of exons 11, 12, 18, 19, 21 and 22 was performed using an automated sequencer ABI Prism - 3130 (Applied Biosystems). **Results:** Clinical data of 135 patients were collected; however, the genetic study was only possible in 125 of these. The mean age of patients was 15.44 ± 11.8 years (median: 13 years) and, at diagnosis, was 10.00 ± 9.6 years (median: 7 years), where 56.3% were male, the majority brown (82.2%). At diagnosis 94.8% of patients were symptomatic: respiratory (92.6%), digestive (34.9%), and 32.6% malnourished. *Pseudomonas aeruginosa* (37.4%) and *Staphylococcus aureus* (49.63%) were the most frequent microorganisms of the respiratory tract. Exon 11 accounted for the majority of the variants found. The allelic frequency of p.508del mutation was 14.8% and of p.M470V was 56.4%. The study showed no association of p.M470V with severity of respiratory disease, but the p.F508del mutation was associated with worsening radiological evolution and *P. aeruginosa* infection. **Conclusion:** The study revealed a delayed diagnosis in this sample, and did not clarify the role of p.M470V in respiratory disease.

Keywords: *CFTR*, cystic fibrosis, mutations, variants

LISTA DE TABELAS

Tabelas do Artigo 1

- Table 1.** Frequency of *CFTR* gene variants in a sample of 125 patients with cystic fibrosis from Northern Brazil.....78
- Table 2.** Phase determination of the p.M470V mutation in Northern Brazilian carriers of p.F508del (n=27/125)79

Tabelas do Artigo 2

- Table 1.** Clinical profile of patients with cystic fibrosis treated at Hospital Universitário João de Barros Barreto, Pará, Brazil..... .87
- Table 2.** Progression of FEV1, radiographic findings (Brasfield score), and Shwachman–Kulczycki scores between the time of diagnosis and and the time of study interview..... 90

Tabelas do Artigo 3

- Tabela 1.** Associação da mutação p.F508del e da variante não patogênica p.M470V com o fenótipo respiratório (n=125 pacientes).....103
- Tabela 2.** Modelos ajustados para a mutação p.F508del e as diferentes categorias de exposição que podem contribuir na evolução para piora no resultado dos exames radiológicos em 125 pacientes com FC do norte do Brasil104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gene <i>CFTR</i> e proteína CFTR	23
Figura 2	Estrutura da Proteína CFTR	25
Figura 3	Classes de defeitos do gene CFTR	27
Figura 1 (Artigo 2)	Nutritional aspects of patients with cystic fibrosis, comparing weight and height at the time of diagnosis and at the time of assessment (n=135)	89
Quadro 1	Escore de Brasfield	51
Quadro 2	Escore de Schwachman-Kulcszyki	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	ATP Binding Casser protein
ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
AMPc	Monofosfato de Adenosina cíclica
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAVD	Congenital Absence of Vas Deferen
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFRD	Diabetes Relacionado a Fibrose Cística
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTGF – 1	Transforming Growth Factor Beta 1
CVF	Capacidade Vital Forçada
DIOS	Síndrome de Obstrução Intestinal Distal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
ENaC	Canal Epitelial de Sódio
EB	Escore Brasfield
ES	Escore Schwachman-Kulczycki
FC	Fibrose Cística
FEF	Fluxo Expiratório Forçado
FEV1	Volume Expiratório Final no primeiro segundo
GCLC	Glutamate Cysteine Ligase Catalitic Subunit
GSTP1	Glutathione S Tranferase P1
HLA	Antígenos de Leucócitos Humanos
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
IP	Insuficiência Pancreática
L	Litro

LISTA DE ABREVIATURAS

MEq	Milequivalente
MTD	Domínio Transmembrana
MSD	Membrane Spaning Domain
Ng	Nanograma
NBD	Nucleotide Biding Domain
NPD	Diferença de Potencial Nasal
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Chanel
PAR	Pancreatite Aguda Recorrente
PC	Pancreatite Crônica
PCI	Pancreatite Crônica Idiopática
R	Regulator
RE	Retículo Endotelial
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNA_t	Ácido Ribonucléico transportador
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Suficiente Pancreático
STR	Short Tandem Repeat
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIR	Tripsina Imonorreativa
TGF	Transforming Growth Factor
VRS	Vírus Respiratório Sincicial
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 O GENE CFTR E A PROTEÍNA CFTR	22
2.2 SÍNTESE DA PROTEÍNA CFTR	25
2.3 EXPRESSÃO DO GENE <i>CFTR</i>	27
2.4 FISIOPATOGENIA	31
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	39
2.6 DIAGNÓSTICO	46
2.7 TRATAMENTO	47
2.8 PROGNÓSTICO	55
2.9 FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL	56
3 JUSTIFICATIVA	58
4 OBJETIVOS	59
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6 ARTIGOS	74
6.1 ARTIGO I	75
6.2 ARTIGO II	85
6.3 ARTIGO III	99
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
8 ANEXOS	114
8.1 ANEXO I	115
8.2 ANEXO II	117
8.3 ANEXO III	119

1 INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é a enfermidade monogênica letal de herança autossômica recessiva mais frequente na população de ascendência européia, com prevalência estimada de 1: 2.000 a 1: 4.000 recém-nascidos vivos, correspondendo a uma frequência de heterozigotos de 1: 25. É causada por mutações no gene cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) (Spinelli et al., 2009; Cebotaru, et al., 2014). Este gene foi identificado e clonado em 1989, está localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31.2) contém 27 éxons, e tem cerca de 250 kb (Bernadino et al., 2000; Cabello et al., 2005; Alibakhshi et al. 2007).

O gene *CFTR* codifica uma proteína de mesmo nome que direta ou indiretamente funciona como um canal de condutância de íons, modulando a secreção de cloro da célula epitelial em resposta a estímulo que eleva AMPc intracelular e/ou ativa proteinoquinase (Rich et al., 1990, Chu et al., 1991). A disfunção do canal de cloro CFTR na FC interrompe o transporte transepitelial de íons e, conseqüentemente, compromete a função de uma variedade de órgãos revestidos pelo epitélio (Sheppard et al., 1999). Sinais/sintomas de FC incluem elevados níveis de cloro no suor, muco viscoso, infecções pulmonares recorrentes, insuficiência de enzimas pancreáticas, obstrução intestinal, infertilidade masculina e doença hepática crônica (Debray et al., 2011). Essas manifestações clássicas de FC podem variar amplamente de leve a muito grave (Bombieri et al., 2011; Cebotaru et al., 2014). As alterações mais importantes da FC ocorrem na superfície da árvore brônquica e trato gastrointestinal, locais onde o gene *CFTR* é expresso nas células epiteliais. A doença costuma ter evolução letal caracterizada por lesões sistemáticas de glândulas exócrinas (Kerem et al., 1990; Bernadino et al., 2000, Cabello et al., 2005; Alibakhshi et al., 2007).

A mutação p.F508del é responsável aproximadamente por dois terços (66%) de todos os cromossomos de FC do mundo, contudo há uma grande heterogeneidade mutacional no terço restante dos alelos. Essas mutações variam muito na sua frequência e distribuição e a vasta maioria delas está limitada a um pequeno número de indivíduos. Aproximadamente metade dos pacientes com FC

nos EUA são homocigotos *p.F508del* e outros 40% são compostos heterocigotos para essa variante. O curso clínico da FC pode ser variável em pacientes apresentando as mesmas mutações, indicando a influência do ambiente e talvez outros fatores genéticos (Rosendahl et al, 2007). Já foram descritas mais de 1900 mutações, e recentemente tem sido descrito a existência de genes moduladores, que poderiam influenciar na expressão da enfermidade, colaborando com sua ampla variedade fenotípica, influenciando no prognóstico e sobrevivência dos pacientes ao longo prazo (Bernardino et al., 2003). Elas são responsáveis por ampla variedade de manifestações, variando de leve doença pulmonar com suficiência pancreática a grave doença pulmonar com insuficiência pancreática, disfunção de glândulas sudoríparas e ductos deferentes (Aguirre et al.,2011; Cohn et al., 2013).

A grande heterogeneidade de mutações do gene *CFTR* é um desafio para os programas de triagem (Cabello et al., 2005). Esse gene tem sido extensivamente caracterizado pela sua variabilidade patológica. Contudo, o estudo de sua completa variabilidade ao acaso, onde mutações causando doença deveriam ser estruturadas, só iniciou recentemente (Pompei et al., 2006). Muito tem se esforçado para compreender o genótipo do FC desde que o gene foi identificado em 1989 (Kerem, 1989; Rommens et al, 1989).

Diferentes mutações de *CFTR*, tais como *p.F508del*, *p.G542X* e *p.N1303K*, estão associadas com fenótipos graves de FC. Contudo, muitas outras mutações estão associadas com doença monossintomática de pulmões, pâncreas e vasos deferentes e mostram penetrância parcial. Importante para resolver esses fenótipos heterogêneos é caracterizar os haplótipos de fundo para cada indivíduo, especialmente para as regiões intragênicos do gene *CFTR*. Várias interações e efeitos aditivos entre múltiplas mutações e/ou locais de polimorfismos codificarão para a função final do produto do gene (Lee et al.,2003; Vanscoy et al, 2007).

Desde a descoberta do gene *CFTR* mais de 1900 mutações e 120 polimorfismos têm sido identificados. A maioria destas mutações é rara, e a relação com a doença ainda não está clara. A penetrância parcial da mutação pode ser explicada por polimorfismos que podem interferir ou mascarar o defeito funcional causado por uma alteração particular de aminoácido. Para o locus *p.M470V*, foi

observado que os dois alelos interferem com o processamento e com a atividade do transporte do cloro da proteína *CFTR* (Wei et al., 2000).

No interior do gene *CFTR* um número de bialélicos (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) tanto como microssatélites (Short Tandem Repeat, STR) agindo como marcadores capacitam elucidação de origem de mutação e evolução histórica de diferentes mutações. Estes marcadores podem ser usados para traçar a origem e evolução de diferentes mutações e definir a estrutura haplótipo estável nas quais mutações *CFTR* ocorrem (Cabello, et al.,2005). Ambos podem ser úteis para diagnóstico indireto de FC, e podem servir como ferramenta para análise de estrutura populacional de homens modernos e sua evolução histórica. Marcadores dialélicos SNP representam tipos relativamente estáveis de polimorfismos genéticos, crucial para a determinação da estrutura haplótipo, a base da origem mutacional. Análise combinada dos tipos de marcadores (SNP e STR) dentro do gene *CFTR* junto com a determinação de haplótipos em cromossomas normais e mutantes promoverá estimativa do grau de desequilíbrio articulado, assim como elucidação da origem e história da evolução de mutações maiores (Korytina, et al.,2003). Diferentes estudos em populações europeias têm sido realizados para definir o papel haplotípico no qual a maior mutação *CFTR* ocorre. Polimorfismos STR (marcadores microssatélites), e SNPs têm sido descritos no gene *CFTR* (Cabello, et al.,2005).

A origem étnica da população brasileira é muito heterogênea resultante de uma variedade de correntes migratórias distribuídas irregularmente pelas regiões brasileiras. Além de portugueses e africanos, em torno de 4,5 milhões de imigrantes, principalmente da Itália e Alemanha, Espanha e Japão vieram para o Brasil (Bernadino et al.,2000; Raskin et al., 2003; Callegari-Jacques, 2011) . Estudos sobre correlação genótipo/fenótipo para a determinação do tipo e frequência de mutações de FC onde há semelhante miscigenação populacional são muito importantes para o prognóstico e aconselhamento genético efetivo (Raskin et al., 1993; Bernadino et al.,2000; Araújo et al. 2005).

FC clássica apresenta doença pulmonar com uma progressão de inflamação, infecção (usualmente por *Pseudomonas aeruginosa*) e muco viscoso, que progridem para bronquiectasias. Correlações entre mutações específicas na *CFTR* e doença pulmonar não estão claras, sendo evidenciadas pela ampla variação nas

manifestações pulmonares entre pacientes homocigotos para a mutação p.F508del (Kerem et al., 1990). Bronquiectasia isolada tem sido referida como uma entidade clínica diferente de FC, no entanto bronquiectasia é um achado comum na FC, sugerindo que em certos casos, bronquiectasias monossintomáticas estão também associadas com mutações *CFTR* (Kapur et al., 2009). Diferentes haplótipos, especialmente com baixa expressão membrana e redução de transporte de HCO₃⁻, foram encontradas estar associado com doença respiratória ou pancreática. Notavelmente, uma adicional variação de p.M470V afeta a intensidade de associação doença e a função de transporte de anion da proteína *CFTR* (Lee et al., 2003).

Estudos de correlação genótipo-fenótipo de algumas manifestações sugerem mais complexa interação, envolvendo outros fatores genéticos e do meio ambiente. Em particular, a gravidade da doença pulmonar, que é a maior causa de morbidade e mortalidade em FC, está pouco relacionada com genótipo *CFTR*. Pacientes carregando a mesma mutação *CFTR* mostram fenótipos pulmonares extremamente variáveis em todas as idades (Gimbovskaia et al. 1994; Morral et al., 1996; Mekus et al., 2000). É postulado que a gravidade de progressão da doença pulmonar na CF seja modulada por fatores genéticos secundários chamados de modificadores da FC (Ruslan et al., 2008).

Um aspecto importante da doença pulmonar na FC é a infecção crônica por patógenos característicos tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e *Burkholderia cepacia*, que levam a inflamação crônica dos tecidos pulmonares e progressiva perda de função pulmonar. Fatores genéticos que influenciam suscetibilidade à infecção são por esta razão de grande interesse (Ruslan et al., 2008). Como o curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão diretamente relacionados ao genótipo específico da *CFTR*, isto sugere uma forte ação de genes modificadores dentro ou fora do locus do gene *CFTR*, eles podem influenciar na gravidade do fenótipo dos fibrocísticos modulando o fenótipo, alterando a condução de cloro, regulando o splicing e a expressão do gene *CFTR*, desta forma condicionando a susceptibilidade à infecção e a resposta inflamatória do fibrocístico (Acton, et al., 2001; Cabello et al., 2001; Faria et al., 2007).

A doença pulmonar na FC pode ser modificada por genes associados com a remoção mucociliar e genes envolvidos no reparo do tecido epitelial. Relação genótipo-fenótipo já foi esclarecida para as manifestações pancreáticas, mas para as manifestações pulmonares ainda não foi estabelecida (Morral et al., 1993; Stephens et al., 2001; Schuerle et al 2012).

A identificação de genes modificadores e suas interações na FC e outras doenças tem apenas começado. Cabello et al. (2006), analisaram três polimorfismos intragênicos, consistindo de dois variantes dialélicos (p.M470V e p.T854T) e um microsatélite IVS8T a cerca de 35 kb do gene *CFTR* e observaram que o gene flui entre diferentes grupos étnicos, podendo resultar em mutações de FC associadas com diferentes haplótipos provavelmente por introduções étnicas diferentes, porém não investigou o impacto destes polimorfismos nas manifestações clínicas da fibrose cística. Polimorfismo p.M470V afeta a intensidade de associação doença e a função de transporte de anion da proteína CFTR. Variantes no IVS8 e o polimorfismo p.M470V estão associados com defeitos na função *CFTR* nas glândulas sudoríparas e no epitélio respiratório. Conhecer a ação dos marcadores genéticos permitirá um melhor entendimento dos aspectos fisiopatológicos, da correlação genótipo-fenótipo podendo maximizar o tratamento da FC. É importante distinguir entre essas categorias de pacientes para evitar abordagens terapêuticas desnecessárias e incorretas suposições sobre o prognóstico. Há muitas questões sobre genes modificadores para serem exploradas por este estudo, começando por reconhecer sua relevância no prognóstico da doença respiratória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas a fibrose cística (FC) emergiu da obscuridade para o reconhecimento como a mais importante doença hereditária, potencialmente letal, com elevada incidência na população caucasóide. Estudos em biologia molecular, transporte iônico e imunologia, culminaram com a identificação, clonagem e sequenciamento do gene da FC em 1989, contribuindo para aquisição de novos conhecimentos sobre os mecanismos bioquímicos responsáveis pela fisiopatogenia da doença, abrindo novos horizontes para o aconselhamento genético, tratamento e melhor abordagem das complicações, assegurando melhor prognóstico e qualidade de vida destes pacientes (Lyczac et al, 2002).

FC é causada por mutações no gene *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane regulator) que afetam uma proteína reguladora transmembrana de mesmo nome. Essas mutações podem impactar a síntese e o transporte da proteína CFTR para a membrana apical das células epiteliais, assim como influenciar a condutância de íons cloro e bicarbonato através do canal (Rosa et al., 2008). Disfunção CFTR resulta em desequilíbrio iônico de secreções epiteliais em vários sistemas orgânicos, assim como o pâncreas, trato gastrointestinal, fígado e sistema respiratório (Nakamura et al., 1987; Angelicheva et al., 1997; Conklin et al., 2008). Na Europa, aproximadamente 2.000 a 3.000 neonatos são diagnosticados com FC e nos EUA esta incidência é referida ser levemente menor que um para cada 3.500 nascimentos (Derichs, 2013).

Genes de suscetibilidade e genes modificadores são dois fenômenos biológicos que não se pode ignorar na era do genoma. Genes de suscetibilidade são genes com variantes funcionais que afetam as causas de doenças, são rotineiramente identificados por doenças mendelianas simples e, mais recentemente, por desordens genéticas comuns. Genes modificadores são distintos de genes suscetíveis, pois são variantes genéticas que afetam as manifestações clínicas das doenças (Haston et al., 2005). Consideráveis esforços têm sido feitos para correlacionar o fenótipo clínico de pacientes FC que apresentam duas mutações

CFTR com fatores ambientais, e variantes do gene. Drumm, et al., (2005) usando o poder de amplo tamanho de amostra em pacientes homocigotos para p.F508del, com doença pulmonar que variou de leve a grave, observaram que uma variabilidade de genes *CFTR* fortuitos em Europeus é elevada e quase completamente restrita para o gene *CFTR* carregando o alelo M do sítio do polimorfismo p.M470V. Este achado tem sido interpretado como um exemplo de seleção abrangente causada pelo surgimento de uma mutação vantajosa no alelo V. (Morral et al, 1994; Claustres et al, 1996).

Esta seleção natural abrangente (“alelo-restrito”) tem sido referida também para várias mutações FC, e particularmente p.*F508del*. A completa associação de p.F508del com alelo M foi confirmada. O resultado deste estudo sugere que mutações raras não definidas como mutações FC são amplas devido a eventos recentes mutacionais que poderiam ter ocorrido ao acaso nos genes *CFTR*. Uma elevada heterogeneidade entre diferentes populações europeias para alelos FC é conhecida (Ciminelli et al., 2007). O espectro de mutações do gene *CFTR* é grande e as mutações podem consistir de polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) ou amplas deleções multiéxons, podendo afetar a biossíntese, maturação, regulação do canal de cloro, condutância e estabilidade da proteína CFTR (Haston et al., 2005).

Genes modificadores influenciam diretamente vias metabólicas e celulares envolvidas na fisiopatologia da suscetibilidade do gene, ou eles podem agir por vias secundárias que estão envolvidas durante o curso da doença. Na FC é necessário compreender a ação de genes que afetam a resistência do hospedeiro e resposta inflamatória para infecções e sua interação com os genes modificadores envolvidos no transporte de cloro (De Vries et al., 1996). Parece que variantes em TGF- 1 (Transforming Growth factor Beta 1) afeta a resposta pulmonar para a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, promovendo bronquiectasias ou regulando a imunidade e não a suscetibilidade para infecção (Wahl, et al., 2004).

A identificação do gene da FC, bem como suas mutações, ofereceu a oportunidade de utilizar o estudo molecular para diagnóstico de FC em algumas situações onde o perfil genético da população é conhecido (Kerem et al, 1990; Bernardino et al., 2000; Cabello et al., 2006). A maioria das mutações do gene *CFTR* identificadas estão distribuídas dentro de seis classes que é responsável por

aproximadamente 80% de todos os pacientes com FC. Das mais de 1900 mutações *CFTR* já identificadas, aproximadamente 20 mutações tem uma frequência de 0,1%. (Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium; <http://www.genetic.sickkids.on.ca/cftr/>). Algumas podem alcançar elevada frequência em populações específicas devido ao seu efeito gerador (Ex. p.M1101K em Hutterites), pelo seu significado genético (Ex. p.G551D nos Celtas) ou por serem recorrentes (Ex. R1162X em Zuni e na população noroeste da Itália) explicando sua presença histórica em populações de diferentes origens (Bodadilla et al., 2002). Indiscutivelmente a variante mais comum é a variante p.F508del, com uma frequência de alelo em torno de 90% no mundo. Somente quatro mutações *CFTR* têm uma frequência 0,1%: p.G551D, p.W1282, p.G542X e p.N1303, tendo uma prevalência em torno de 1- 3% cada (Derichs, 2013).

Numerosas anormalidades fenotípicas têm sido observadas no epitélio FC, incluindo um aumento da absorção de sódio pelo epitélio respiratório. O tipo de mutação determina o defeito na biossíntese da proteína CFTR e de acordo com a alteração na função do canal, se tem sugerido que determina ou condiciona a gravidade de apresentação da enfermidade (Navarro et al, 2002). A mutação afeta o gene *CFTR* através de variados mecanismos moleculares, que leva para pouca ou nenhuma função da CFTR no ápice de membrana das células epiteliais. O defeito no transporte do íon resulta em acúmulo de muco viscoso em relação á superfície epitelial em muitos órgãos, incluindo pulmão, seios da face, pâncreas, trato gastrointestinal, sistema hepatobiliar, glândulas sudoríparas e aparelho reprodutor (Bronsveld et al., 1999; Ollero et al., 2006). A análise genética tem mostrado que paciente sintomático pode ser heterozigoto, indicando que uma lesão no gene *CFTR* pode ser suficiente para causar uma doença pulmonar semelhante a FC (“FC-Like”) (Navarro et al,2002; Chauan, 2009).

A elevada frequência de mutações no gene *CFTR* tem levado para o reconhecimento dessa associação com uma variedade de condições, incluindo bronquiectasias, pólipos, infertilidade masculina e pancreatite crônica (Bernardino et al., 2003). Recentemente, se tem conhecido a existência de genes moduladores que poderiam influir na expressão clínica da enfermidade e colaborar desta maneira para sua ampla variabilidade fenotípica, assim como influir no prognóstico e na sobrevivência dos pacientes em longo prazo (Aguirre et al., 2011).

Mutações FC não são igualmente distribuídas entre diferentes populações, e painéis de seqüenciamento são técnicas inapropriadas para detectar mutações raras. Um dos obstáculos para estudos abrangentes do gene *CFTR* é a sua grande dimensão, abrangendo 27 éxons com elevado número de mutações e polimorfismos que já descritos (Weiss et al 2005).

2.1 GENE *CFTR* VERSUS PROTEÍNA *CFTR*

O gene *CFTR* foi identificado em 1989 e está localizado no braço longo do cromossoma 7, na posição q31 - 32 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al. 1989). Dados mostram que mais de 1900 seqüências de variações já foram descritas, contudo um entendimento detalhado de como a mutação *CFTR* impacta a disfunção do canal está limitada para algumas poucas mutações. Isto implica em uma lista relativamente pequena de mutações *CFTR* bem definidas como causadoras de doença FC, já que a consequência funcional de várias raras variações de seqüências permanece desconhecida ou não tem mostrado ser uma doença causando FC (Derichs et al., 2013). (Figura 1)

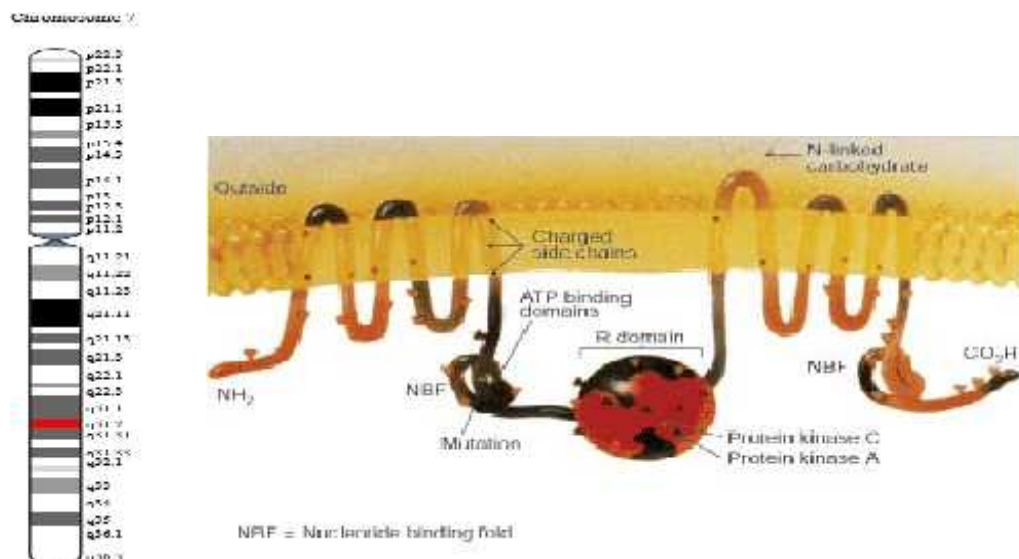


Figura 1. Gene *CFTR* e proteína *CFTR*

A proteína CFTR codificada pelo gene da FC é um canal de íon cloro dependente de monofosfato adenosina cíclica (AMPc), composta de 1480 aminoácidos localizada na membrana apical de células epiteliais, onde controla o movimento transepitelial de sais e líquidos; regulando o fluxo de cloro. A disfunção de CFTR promove a produção de secreções viscosas que obstruem os ductos das glândulas principal característica da FC (Sheppard et al., 1999; Navarro et al., 2002). Ela é composta por cinco domínios: dois domínios transmembrana (TMD1/TMD2 ou MSD) que formam o poro canal, dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1/NBD2) e um domínio regulador (R). A fosforilação por proteinoquinase A do domínio R determina a atividade de canal e a hidrólise do ATP pelos NBDs controla o canal de entrada para a passagem de íons (Figura 2). A fosforilação é controlada pelos NBDs. O processo inteiro de abertura e fechamento do canal é chamado “gating” (Wei et al., 2000; Derichs, 2013). Transporte de cloreto através do canal CFTR trabalha em conjunto com o transporte de sódio através dos canais de epiteliais de sódio (ENaC) para manter o sal, líquido, o pH e a homeostase em vários tecidos epiteliais (Rowe et al. 2005).

MSD e NBD são ligados por um único domínio chamado R (regulador), que contém vários sítios de fosforilação e muitos aminoácidos. Estudos funcionais sugerem que o domínio R e NBDs são localizados no lado intracelular da membrana (Sheppard et al., 1999). Quando o gene de codificação da proteína CFTR foi identificado em 1989, não se sabia se CFTR era um canal de cloro de membrana apical regulada por fosforilação AMPc dependente ou se apenas regulava o canal (Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989).

Medidas de potencial reversas com diferentes concentrações de gradientes de NaCl indicou que o canal de íon cloro CFTR é mais seletivo para os ânions que os cátions, sugerindo significativamente maior permeabilidade ao cloro que ao sódio. Foi observada também permeabilidade para uma grande variedade de ânions poliatômicos de dimensões conhecidas além do cloro, incluindo NO₃⁻, HCO₃⁻, acetato entre outros (Sheppard et al., 2009).

A proteína CFTR pertence a uma família de proteínas transportadoras ABC (ATP – Binding Cassette). Membros desta família tem funções diversas, mas compartilham as mesmas características estruturais. A família é definida pela

presença de NBDs, que tem uma sequência primária altamente conservada, e a presença de MSD, que conserva características topológicas mas com diferenças nas sequências de aminoácidos. Uma proteína transportadora ABC forma um canal de íon. A hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) na CFTR produz alterações na conformação que abre e fecha o poro (Sheppard et al., 2002; Zhon et al., 2011). A regulação da atividade do canal de cloro é controlada pelo balanço de atividade das quinases e fosfatases. A Proteinoquinase A é a mais importante quinase responsável por regular a atividade do canal de cloro, contudo outras quinases podem fosforilar a proteína CFTR e abrir o canal. O domínio R regula a CFTR mantendo o canal fechado quando em repouso (Ma et al., 1996).

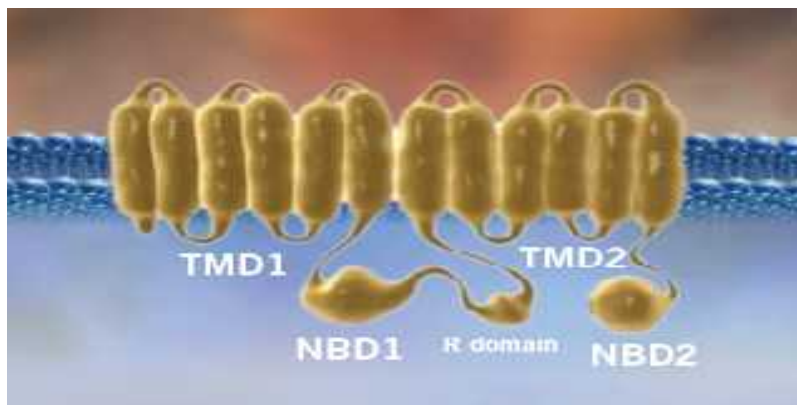


Figura 2. Estrutura da proteína CFTR

Em condições normais da função dos canais CFTR nas glândulas do suor, os íons cloreto são normalmente reabsorvidos através destes canais. Em geral, a concentração de cloreto no suor numa pessoa saudável é inferior a 40,5 mmol/L. Nas vias aéreas, íons cloreto são secretados através dos canais CFTR. Estes canais trabalham em conjunto com os canais epiteliais de sódio (ENaC). O saldo da secreção de cloreto através CFTR e reabsorção de sódio através ENaC mantém um volume normal do líquido na superfície das vias aéreas, permitindo os cílios movimentarem livremente. (Arnold et al., 1997; Ollero et al., 2006). Isso permite que os patógenos, as partículas e o ar sejam eliminados das vias aéreas, contribuindo para a integridade das vias respiratórias. No pâncreas os canais CFTR permitem a passagem de íons cloreto e bicarbonato no lume de ductos pancreáticos. O fluxo

regulado de íons mantém o volume e pH adequado das secreções para permitir uma função pancreática normal (Rowe et al.2005; Chee et al, 2011; Cebotaru et al., 2013)

2.2 SÍNTESE DA PROTEÍNA CFTR

Em circunstâncias normais, sinais extracelulares instigam a expressão do gene *CFTR* por promover sua transcrição dentro do núcleo para o RNAm. O molde de cordão único resultante migra através de poros nucleares para interagir com ribossomos no citoplasma ou no retículo endoplasmático, onde em combinação com o RNAt (transportador), o gene *CFTR* é traduzido em uma cadeia de aminoácidos. Os polipeptídios resultantes são montados em um produto de proteína CFTR imatura, que subsequentemente é dobrado dentro da dupla camada lipídica do retículo endoplasmático. Após a maturação no RE, a proteína CFTR é então transferida para o Corpúsculo de Golgi para modificação pós-translacional e envolvido em vesículas de transporte, sendo finalmente levados para a superfície celular para a expressão final na membrana apical das células (Figura 3) (Derichs et al., 2013).

Mutações no gene *CFTR* podem impactar cada nível na síntese da proteína, desta forma foram atribuídas seis classes para as mutações deste gene. As mutações de Classes I podem resultar de uma mutação “nonsense” e “frame-shift”, assim como defeito no splicing RNAm. A mutação p.G542X é uma mutação nonsense ou mutação de parada, onde introdução de um códon prematuro de parada resulta em cessação prematura de translação e produção de proteína CFTR truncada, resultando em defeito na produção da proteína. Na Classe II, uma dobra ou defeito na maturação bloqueia o processamento no ER sendo incompletamente glicosilada e rapidamente degradada em proteosomas (a mais comum é a p.F508del). Mutações Classe III e IV são representadas por função aberrante do canal em vez de reduzir a quantidade de CFTR. Nas mutações de Classe III uma proteína é produzida com defeito na regulação, ela age na superfície porém não conduz o cloro resultando em limitado canal funcionante que surge da ligação

ineficaz de nucleotídeo (Ex. mutação G551D que representa 2 – 3% da mutações *CFTR* no mundo). Canais *CFTR* com mutações de Classe IV são capazes de abrir e fechar o canal, contudo íons cloro e bicarbonato são incapazes de passar livremente através do canal devido a um defeito na condutância (Ex. p.Rqq7H). A mutação Classe V afeta a síntese ou splicing, causando menor quantidade de proteína produzida (A455E) determinando um fenótipo leve com teste do suor limítrofe, moderada doença pulmonar em pacientes pancreato suficientes. Finalmente, uma nova classe de mutações a Classe VI é caracterizada por elevada renovação epitelial (Conklin et al., 2008; Aguirre et al., 2011; Cebotaru et al., 2013; Derichs, 2013).

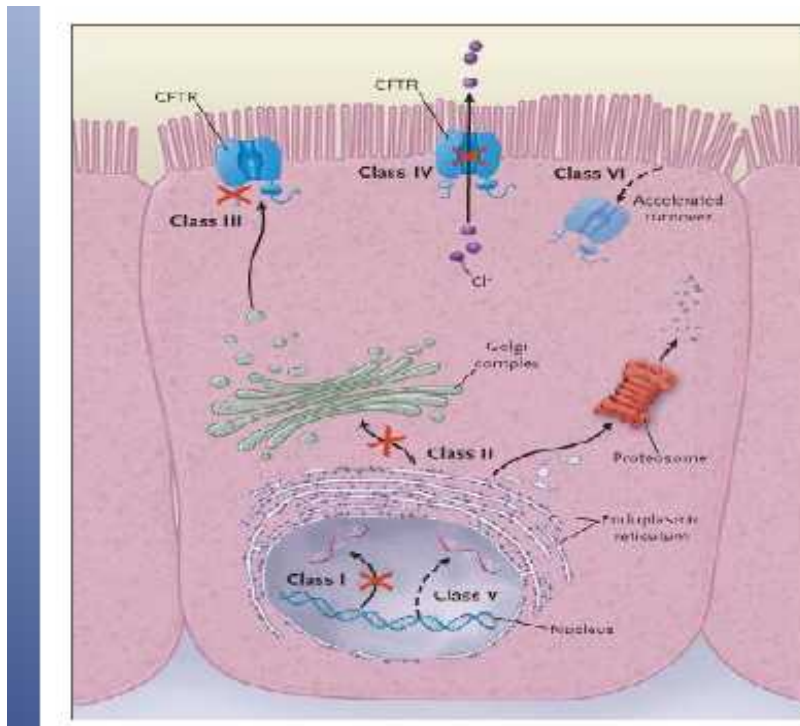


Figura 3. Classes de defeitos do gene *CFTR* Classe I (ausência de síntese proteica), Classe II (defeito na maturação da proteína e degradação precoce), Classe III (distúrbio na regulação, como ligação ATP e hidrólise), Classe IV (defeito na condutância do cloro, disfunção do canal) Classe V (reduzido número de *CFTR* transcrito devido a uma anormalidade na transcrição do gene ou splicing) e Classe VI (turnover acelerado das células superficiais)

2.3 EXPRESSÃO DO GENE *CFTR*

Há fortes evidências que mutações causando FC existem desde o período Paleolítico e estão fortemente associadas com a origem da população européia. (Bobadilla et al., 2002) A FC é uma doença genética comum e clinicamente heterogênia multissistêmica que afeta glândulas e epitélio secretor. Contudo a maioria dos pacientes apresenta uma doença pulmonar crônica e insuficiência pancreática, aproximadamente metade dos pacientes com FC nos EUA são homocigotos p.F508del e outros 40% são compostos heterocigotos, que tem um alelo p.F508del mais uma mutação menos comum em outro alelo. A mutação *F508del* é uma deleção de três nucleotídeos na posição 508 do códon causando uma deleção da fenilalanina e subsequente defeito intracelular no processamento da proteína CFTR (Conklin et al., 2008).

Quando estudado o conjunto populacional nos EUA, duas mutações são de especial interesse, a chamada p.R1162X e a 3849+10kbc→T. A mutação p.R1162X tem sido encontrada em certas populações nativas americanas. Pacientes hispânicos com FC apresentaram 3849+10kbc →T, também tendo sido encontrada entre Mexicanos e populações do sudoeste do EUA, porém sendo rara na Europa. Pacientes com esta mutação podem não apresentar níveis de eletrólitos elevados no suor, porém desenvolvem uma doença pulmonar de curso moderado a grave. Um dos maiores contribuintes genéticos Europeus da população da América Latina foi a Espanha. Contudo, a frequência da mutação 3849+10kbc →T não é elevada na população Espanhola, sugerindo que os povos indígenas das Américas são a fonte de introdução dessa e de outras mutações na população americana, portanto é esperado o achado desta e de outras variantes mutacionais do gene *CFTR* em populações da América Central e América do Sul (Bobadilla et al, 2002).

Uma grande quantidade de informações sobre o gene *CFTR* tem sido relatada, notavelmente o desenvolvimento de técnicas de análise molecular resultando no desenvolvimento de painéis de mutações de elevada sensibilidade já disponíveis para muitas populações ou grupos étnicos. O significado de mutações raras no campo diagnóstico, correlação fenótipo-genótipo em um indivíduo, e a relevância clínica de alelos complexos e genes modificadores levantam muitas questões. A maioria das mutações *CFTR* tem sido associada com populações de origem Européia. Há também mutações em populações de origem não Européia como Africanos e Leste Asiático, mas nenhum alelo tem alcançado uma frequência tão elevada quanto a mutação F508del. Mutações *CFTR* varia em sua frequência e distribuição em diferentes populações, desta forma poucas mutações têm uma frequência mundial maior que 0,1%, mas algumas podem alcançar elevadas prevalências em algumas populações (Riordan et al, 1994; Lee et al., 2003; Bobadilla et al., 2002).

Quando se demonstrou que *CFTR* era um canal de cloro, foi possível investigar a relação entre estrutura e função. Assim *CFTR* é central como determinante do transporte transepitelial de sal, fluxo de líquidos, e concentração iônica. Disfunção do canal de cloro na FC interrompe o transporte transepitelial de íons e, conseqüentemente a função de uma variedade de órgãos revestidos pelo epitélio, que leva a uma ampla variedade de manifestações da doença, incluindo doença de vias aéreas, insuficiência pancreática, íleo meconial, infertilidade masculina, e níveis elevados de sal no suor (Zhon et al. 2011, Stank et al, 2011). Os mecanismos pelos quais cada mutação *CFTR* afeta a atividade do canal de cloro são pouco esclarecidas. Nos últimos anos, vários autores têm atraído a atenção nas mutações nucleotídeo simples afetando a eficiência do splicing e levando para diferentes níveis de transcrições aberrantes (Ramos et al., 2010).

A composição, frequência e tipo de mutação *CFTR*/variantes paralelas e espectro de fenótipos *CFTR* associados, desde FC clássica para a leve apresentação monossintomática, talvez crie uma necessidade para revisão de critérios diagnósticos e um dilema para estabelecer o limite entre FC e outras doenças de etiologia *CFTR* (Conklin L. et al., 2008; Chauanet al., 2009).

A determinação de haplótipos informativos poderia facilitar a busca de mutações FC dentro de uma população e conhecer sua história evolutiva. A mutação p.F508del e os SNPs p.M470V e p.T854T estão em equilíbrio de ligação. O polimorfismo T854T foi encontrado em 29% da população estudada de Valparaíso no Chile e o haplótipo p.M470V foi encontrado em maior frequência associado com a mutação F508del (Vera et al.,2005).

Marcadores dialélicos SNP representam tipos relativamente estáveis de polimorfismos genéticos, crucial para a determinação da estrutura haplotípica, a base da origem mutacional. Análise combinada dos tipos de marcadores (SNP e STR) dentro do gene *CFTR* junto com a determinação de haplótipos em cromossomas normais e mutantes promoverá estimativa do grau de desequilíbrio articulado, assim como elucidação da origem e história da evolução de mutações maiores (Korytina, et al.,2003). Para poder explicar os fenótipos associados com mutações específicas *CFTR*, análises dos defeitos causados por estas mutações na maturação e níveis eletrofisiológicos devem ser feitos no seu próprio fundo genético. Lamentavelmente, o fundo genético é desconhecido para a maioria das mutações (Wei et al., 2000). Quantificar estas diferenças poderia explicar as variadas expressões da doença encontrada em pacientes com doença *CFTR* relacionada (Ramos et al.,2010).

A parcial penetrância de uma mutação pode ser explicada por polimorfismos. A presença de polimorfismo no mesmo alelo pode interferir ou mascarar o defeito funcional causado pela alteração de um aminoácido particular. Para o locus p.M470V, foi observado que os dois alelos interferem ambos com o processamento e com a atividade de transporte de canal de cloro para a proteína CFTR. Estudos prévios mostraram que p.M470 fornece um aumento de função para um canal de cloro com uma significativa melhora da probabilidade de abertura, quando comparado para V470. Assim, variantes p.M470 e p.R1235 fornecem aumento para uma hiperatividade do canal de cloro quando presentes em alelos separados, mas induz um canal com características V470 quando eles são encontrados no mesmo alelo, desta forma o efeito “hiper” é então suprimido. (Wei et al., 2000) Efeitos combinados com o locus M470V podem influenciar a completa função do produto do gene p.Q1352H, visto que ambos parecem estar envolvidos na interação dos dois NBDs da CFTR, isto porque p.M470V e p.Q1352H estão localizados no NBD1 e

NBD2 respectivamente, sugerindo que o polimorfismo pode afetar a função do gene (Lee et al., 2003).

Na FC monossintomática, uma específica variante haplotípica parece afetar a penetrância da mutação. O alelo presente para o locus polimórfico M470V afeta a biogênese da proteína *CFTR* e a barreira do canal *CFTR*, com proteínas M470 *CFTR* aumentando em 1,7 vezes a atividade intrínseca do cloro quando comparada com proteína V470 *CFTR*. Em pacientes com FC, suficiente pancreático (SP), o diagnóstico de pancreatite pode preceder o diagnóstico de FC. Um amplo estudo de 10.071 pacientes encontrou que 10,3% de pacientes com FC-SP sofrem de pancreatite e que indivíduos heterozigotos para *CFTR* apresentaram maior suscetibilidade a desenvolver PC (De Boeck et al., 2005).

Variações na sequência poly-T no íntron 8 do gene *CFTR* pode afetar a função desse gene e a variante alélica 5T tem mostrado reduzir a função do gene *CFTR* mesmo quando em heterozigose. A variante 5T ocorre em 5% de cromossomas da população geral e difere das variantes 7T e 9T porque ele atrapalha splicing de *CFTR RNAm*. O alelo 5T reduz a eficiência do splicing éxon 9 e esse splicing anormal reduz a expressão da função da proteína *CFTR* (Aoyagi et al., 2001).

Oskoei et al. (2012), estudando marcadores polimórficos intragênicos, concluiu que ambos polimorfismos p.M470V e p.IVS8 polyT podem ser úteis no diagnóstico pré-natal de FC em Iranianos do Norte, provenientes de famílias com história positiva de doença.

Mutações e polimorfismos do gene *CFTR* têm sido pouco estudadas no leste Asiático, devido á rara frequência de FC clássica nesta população, porém extensivamente estudados nas populações ocidentais. Bronquiectasias monossintomáticas parecem estar associadas com mutações no gene *CFTR*, assim como muitos casos de PC monossintomática. Foi observado que a mutação p.F508del é raramente observada na população asiática, mas outros haplótipos, especialmente mutações com redução da expressão de membrana e reduzido transporte de HCO₃⁻ foram associados com doença respiratória e pancreática, notavelmente a variação polimórfica p.M470V que mostrou afetar a intensidade de

associação doença e com a função de transporte iônico da proteína CFTR (Lee et al. 2003).

Genes envolvidos na resposta imune inata tal qual manose e lecitina 2 (mannose binding Lectin 2 – MBL 2) e genes reguladores tais como transformador de fator de crescimento beta 1 (TGF 1) exercem um papel na progressão da doença pulmonar na FC afetando a infecção e induzindo a resposta inflamatória nos pulmões. Modificadores genéticos têm sido também identificados em outros órgãos com manifestações de FC incluindo a doença hepática e íleo meconial. Constituintes da membrana apical incluindo as proteínas transportadoras SLC913 e SLC6A14 que tem sido encontrado estar associada com íleo meconial isto mostra a evidência de efeitos pleiotróficos (maior risco de íleo meconial e manifestações de doença pulmonar na criança). Polimorfismos nos genes da via metabólica da glutathione foram descritos na FC, incluindo os genes Glutathione S- transferase P1 (GSTP1) e Glutamate-Cysteine Ligase, Catalytic Subunit (GCLC) que têm sido associados com maior gravidade clínica na FC (Grasemann et al., 2013; Marson et al., 2013).

Os estudos genéticos devem identificar moléculas ou vias que são importantes na patogênese da doença pulmonar na FC e poderia ajudar a identificar pacientes de risco que poderia se beneficiar com o tratamento específico direcionado para os modificadores da doença (Grasemann et al., 2013).

2.4 FISIOPATOGENIA

As mudanças patológicas no pâncreas estão entre os primeiros sinais a serem reconhecidos na doença inicialmente conhecida como “FC do pâncreas”. Surgem nas primeiras vinte semanas de gestação com acúmulo de secreções eosinofílicas com dilatação dos ductos podendo ser visto no pâncreas exócrino pós-natal, há dano tecidual devido á liberação de enzimas líticas com perda de ácinos, fibrose, substituição por gordura e conseqüente insuficiência pancreática. Isto frequentemente causa sintomas clínicos proeminentes de FC na infância (Sheppard, 2002).

No pâncreas, a disfunção *CFTR* produz secreções viscosas, deficientes em água e bicarbonato, que podem facilmente formar tampões que obstruem os ductos intralobulares com conseqüente digestão retrógrada da glândula, levando ao desaparecimento dos ácinos, que são substituídos por tecido fibroso rodeado por zonas císticas. Progressivamente, a glândula vai se atrofiando. Nos pacientes com FC episódios de pancreatites isolados ou repetidos; pode ser uma forma atípica de apresentação da enfermidade (Derikx et al., 2010; Aguirre et al., 2011; Schule et al., 2012).

Aproximadamente 85% dos pacientes têm grave perda de tecido pancreático com inadequada secreção de enzimas digestivas levando a má absorção. Pacientes com suficiência pancreática tem um melhor prognóstico e usualmente não desenvolvem a doença hepatobiliar e obstrução do intestino (Sheppard et al., 2002).

A presença de tecido acinar é necessária para ocorrer pancreatite, desta forma pancreatite raramente ocorre em pacientes que são IP, contudo, somente 15 a 20% de pacientes com PS-CF desenvolvem pancreatite, sugerindo a potencial contribuição do gene *CFTR* (Chee Y et al., 2011). Há uma forte associação entre mutações no gene *CFTR* e pancreatites. Os genótipos anormais nestes pacientes parecem estar associados com homens inférteis (Weiss et al., 2005; Cohn et al., 2013).

A lesão hepática típica da FC, relacionada ao defeito *CFTR* é a cirrose biliar focal, que resulta da obstrução biliar e fibrose periportal progressiva evoluindo para cirrose biliar multilobular, hipertensão portal e complicações relacionadas (Debray et al., 2011). A doença hepática referida á FC (CFLD) é um termo não específico sem definição consistente que tem sido usado para definir várias alterações hepáticas com amplo espectro de gravidade e impacto na evolução levando á confusão, incluindo colestase neonatal, elevação de aminotransferases, esteatose hepática, cirrose biliar focal e cirrose multibiliar com ou sem hipertensão portal. (Flass et al., 2013)

Infiltração gordurosa do fígado tem sido descrito em 30% de todos os pacientes com FC e pode não estar associado com o defeito secretório da Fc, podendo ter origem iatrogênica. Análises de enzimas hepáticas têm baixa sensibilidade e especificidade para detectar precocemente doença hepática

associada à FC, e a biópsia pode não representar o local onde a lesão já está estabelecida. Hepatocarcinoma é raro na FC. Fibrose biliar focal é considerada uma lesão histopatológica comum em FC e tem sido estimada estar presente em 78% dos pacientes maiores de 24 anos. Foi postulado que a secreção viscosa e /ou uma resposta inflamatória dentro do ducto biliar intra-hepático resulte em espessamento periductal e fibrose (Sheppard et al., 2002; Robertson et al., 2006, Debray et al., 2011).

Uma anormalidade comum é microvesícula que tem sido encontrada em mais de 30% dos pacientes com FC em séries de autópsia. Tem sido relatado que a presença de secreção espessa e/ou resposta inflamatória, resulte em atresia ou estenose do ducto cístico. Anormalidades Ductais intra-hepáticos têm sido encontradas em 100% dos pacientes com FC com conhecida doença hepática e em 50% dos pacientes sem doença hepática referida (Robertson et al., 2006).

A fisiopatologia da doença de respiratória na FC é muito mais complexa, pois, a proteína CFTR além da função no canal de cloro, tem sido implicada na regulação de outras vias de condutância de íons na membrana apical do epitélio respiratório, através de interações com o canal epitelial de sódio amiloride sensível (ENaC) e outwardly rectifying chloride channel (ORCC) (Sheppard et al., 2002). Estudos feitos em porcos também mostraram a deficiência de transporte mediada por CFTR de bicarbonato e regulação do pH da superfície líquida das vias aéreas inibindo a função antimicrobiana das vias aéreas na FC (Grasemann et al., 2013). Sobrepondo-se essa diversidade funcional da proteína CFTR ela tem um padrão altamente regulado pela expressão do gene *CFTR* no pulmão. Essa heterogeneidade ocorre em ambos os níveis de expressão da proteína CFTR em diferentes tipos de células nas vias aéreas e localização anatômica dessas células nos pulmões. A evolução do dano pulmonar é altamente variável na FC mesmo em pacientes com a mesma mutação *CFTR*, e é provável que polimorfismos de antígenos de leucócitos humanos (HLA) classe II contribuam para a inflamação pulmonar (Sheppard et al., 2002).

Histologicamente células do epitélio nasal apresentam modificações (hiperplasia secretória ou metaplasia escamosa) (Ollero et al., 2006). O envolvimento dos seios paranasais é iniciado pela obstrução dos óstios pelo muco viscoso, se

transformando em um reservatório para infecção descendente para os pulmões (Batsakis, 1996).

Os pulmões parecem normais ao nascimento, contudo um estudo em pulmões de fetos durante o segundo trimestre de gestação mostrou acúmulo de mucinas nas glândulas traqueobrônquicas. Mesmo antes da infecção ser clinicamente detectada, há hipertrofia da glândula submucosa, obstrução ductal e hiperplasia de células mucosas da traquéia e brônquio principal com hipersecreção de muco. As glândulas seromucosas estão aumentadas de volume com ductos dilatados preenchidos com secreções viscosas. Uma vez que a infecção se instala, as vias aéreas são preenchidas com material mucopurulento espesso contendo colônias de bactérias, neutrófilos e muco viscoso, e há frequentemente proliferação papilar do epitélio subjacente. A bronquite e a bronquiolite estão associadas com uma mistura de infiltrado de células de inflamação aguda e crônica incluindo neutrófilos, histiócitos, linfócitos e células do plasma. Hiperplasia folicular proeminente é frequentemente visto (Sheppard et al 2002).

O transporte anormal de cloro através das membranas epiteliais causa uma deposição de muco excessivamente viscoso, que contém mais sulfato e fucose que indivíduos normais. Um mecanismo intracelular compensatório para o defeito na CFTR, resulta em mais sulfatação de glicoproteínas. A viscoelasticidade desta mucinas provavelmente interfere com o clearance mucociliar favorecendo a infecção bacteriana, particularmente por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bronsveld et al, 1999). Da mesma forma os movimentos ciliares das vias aéreas superiores também estão alterados. As bactérias alcançam o trato respiratório inferior por via fisiológica de microaspiração estimulando uma resposta inflamatória intensa e excessiva que lesam o tecido pulmonar. Bactérias da orofaringe, que tem habilidade para causar doença do trato respiratório inferior podem colonizar os pulmões, gerando uma resposta inflamatória com exsudato intraluminal com numerosos leucócitos plimorfonucleares. As vias aéreas se tornam tipicamente colonizadas com bactérias que não podem ser erradicadas, levando para bronquite, bronquiectasias e finalmente fibrose pulmonar com falência respiratória. Todas essas alterações podem ser complicadas com hemoptise maciça e pneumotórax (Smith et al., 1997; Bronsveld et al, 1999).

A infecção bacteriana crônica e a exagerada resposta imune observada na FC são responsáveis por dano estrutural nas vias aéreas e no parênquima. Elastase provenientes dos neutrófilos está presente em grande quantidade no escarro dos pacientes. Inflamação crônica das paredes das vias aéreas leva a mudanças irreversíveis, como bronquiectasias. As vias aéreas se tornam um reservatório de grande quantidade de bactérias, mediadores inflamatórios e DNA liberados dos núcleos de neutrófilos destruídos. A maioria das alterações estruturais é irreversível. A presença de bronquiectasias pode levar a dano do tecido pulmonar sadio adjacente. A lesão das vias aéreas na FC vai comprometer o transporte mucociliar e facilitar a adesão e crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (Tiddens, 2002). Desta forma, a doença está associada a infecções respiratórias recorrentes ou persistentes. O ciclo vicioso entre inflamação, infecção e lesão pulmonar resulta em progressivo declínio da função pulmonar e morte (Rovedder et al., 2008).

Durante a primeira década de vida, *Staphylococcus aureus* e notavelmente *Haemophilus influenza* são os agentes mais comuns associados à infecção respiratória nos pacientes com FC (Koch, 2002). O *Staphylococcus aureus* está associada à infecção durante os primeiros anos de vida, estando presente em 40 % dos lactentes nos primeiros três meses de vida, precedendo a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que a infecção por este *microorganismo* é que inicia a injúria pulmonar. Após 18 anos de idade, 80% dos pacientes portam *P. aeruginosa* e 3,5% portam *Burkholderia cepacia*. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, e micobactéria não tuberculosa (Rajan et al., 2002; Sheppard et al., 2002).

Espécimes de Lavado Broncoalveolar feitos em lactentes mostraram a presença de números crescentes de leucócitos neutrófilos polimorfonucleares, aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias e revelou que infecções de vias aéreas inferiores podem ocorrer cedo na vida, mesmo em crianças aparentemente assintomáticas (Koch, 2002).

Como consequência de infecções repetidas, tratamento de longa duração com antimicrobianos e progressiva deterioração da função pulmonar, ocorre a colonização por bacilos Gram-negativos multirresistentes (*Stenotrophomonas*

maltophilia, *Achromobacter spp.* e complexo *Burkholderia cepacia*), principalmente em pacientes adultos (Oliver et al., 2009).

A aquisição e a persistência de *P. Aeruginosa* no trato respiratório inferior dos pacientes com FC estão associadas com maior morbidade e mortalidade (Rovedder et al., 2008). A infecção pela *Pseudomonas aeruginosa* ocorre quando após um processo infeccioso prévio ocorre a perda da barreira de fibronectina da superfície celular, favorecendo a adesão bacteriana (Döring et al., 2000). Zar et al.(1995) observaram que pacientes homozigóticos para a mutação *F508del* apresentavam maior risco de colonização por *Pseudomonas aeruginosa* que os heterozigotos e indivíduos normais, pois estes apresentavam maior número de recptores asililados para as fímbrias da *Pseudomonas aeruginosa* na superfície das células das vias respiratórias. Diversas enzimas produzidas por estes microorganismos parecem ter um papel importante no estabelecimento da colonização inicial persistente incluindo a elastase e protease alcalina que podem interferir com mecanismos de defesa não específicos (fagocitose) e específicos (T-cells, NK-cells, imunoglobulinas). Como estratégia de sobrevivência a *Pseudomonas aeruginosa* se desenvolve em microcolônia com matriz de alginato, produz beta-lactamases e altamente resistente aos antibióticos (Döring et al., 2000). A maioria dos componentes da camada celular da microcolônia é derivada de restos celulares proveniente da reação inflamatória do hospedeiro (DNA e actina proveniente dos neutrófilos). A variedade mucóide está presente em 40 a 80% dos FC (Pier et al.,1997; Moss, et al., 2002). A infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* está associada com injúria pulmonar crônica e reduzida sobrevida, considerando que raramente ela é erradicada (Rybtke et al,2011).

Burkholderia cepacia tem sido isolada em pacientes mais velhos e seu isolamento tem sido casualmente associado com um rápido declínio na função pulmonar. O Complexo *Burkholderia cepacia* foi primeiramente descrito como patógeno em pacientes com FC no período de 1970 a início de 1989. Descrições iniciais documentaram a virulência da bactéria como um patógeno resistente a múltiplas drogas, tendo sido denominada “*Síndrome Cepacia*”, pois manifestava por febre elevada, bacteremia e rápida deterioração pulmonar levando a óbito de 62% a 100% dos pacientes. A infecção pelo complexo *Burkholderia cepacia* pode causar

um declínio na função pulmonar e uma redução da sobrevida. Vários pacientes apresentaram infecção crônica por *Burkholderia Cepacia* e outras parecem ter infecção transitória ou intermitente ou colonização. *B. Cenocepacia* pode ser mais virulenta e mais propensa a ser transmitida de paciente para paciente. Tem sido investigado o impacto clínico de diferentes genótipos e *Burkholderia* multivorans tem sido descrita em centros de transplantes de pulmões (Saimann et al., 2004).

Leveduras e fungos filamentosos também são encontrados em abundância no muco de pacientes com FC. O papel dos fungos nas vias aéreas dos pacientes com FC ainda não está esclarecida (Masoud-Landgraf et al., 2013). *Pneumocystis jirovecii* é classificado como um fungo atípico capaz de crescer em culturas específicas para fungos e exibe um tropismo pelos pulmões de hospedeiros humanos. O papel da colonização por *Pneumocystis* no curso natural da doença pulmonar na FC não foi esclarecido, mas pacientes colonizados por *Pneumocystis. jirovecii* se tornam reservatório e agem como fonte para a propagação para indivíduos suscetíveis, sendo consistente com achados de infecção contínua e posterior ciclo (Hernández-Hernández et al., 2012).

Tem sido observado a patogenicidade de espécies derivadas da cavidade oral e usualmente consideradas como clinicamente insignificantes como os anaeróbios e membros do grupo *Streptococcus milleri* e a complexa interação entre patógenos típicos e microbiota, assim como a associação entre *Pseudomonas aeruginosa* e anaeróbios. *Cândida albicans* e *Cândida parapsilosis* podem também compor a flora oral e migrar para as vias respiratórias baixas e persistir neste novo ambiente. Contudo as implicações de *Candida albicans* no declínio da função pulmonar têm sido sugeridas. *Aspergillus. fulmigatus*, como oportunistas representam os agentes mais comuns de infecções fúngicas, sendo referido com frequência uma vez que está associado com significado clínico na FC e uma mudança na população de genótipos durante a colonização crônica. Colonização crônica pode ter um impacto substancial no desenvolvimento da doença pulmonar (Bjarnsholt et al., 2010).

Tanto bactérias como fungos possuem habilidade para formar biofilme. Neste contexto, interações entre os microorganismos direta ou indiretamente têm sido documentadas, particularmente com principal patógeno da FC a *Pseudomonas aeruginosa*. A *Pseudomonas aeruginosa* pode produzir substâncias que modulam o

crescimento de outros microorganismos particularmente os fungos. *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* podem coexistir, ou ter uma influência antagonista como foi recentemente proposto entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*. *Candida albicans* produz farnesol, em que além de sua função de quorum sensing, regula morfogênese da levedura e a sua capacidade de modificar o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e reduz a concorrência de outros fungos como *Aspergillus fumigatus* (Delhaes et al., 2012).

Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA) foi associada pela primeira vez com FC em 1965 e aproximadamente 50% a 60% dos pacientes têm infecção respiratória por fungos. Usualmente *Aspergillus fumigatus* são encontrados no escarro e podem desenvolver anticorpos precipitinas no soro. Pacientes com FC apresentam predisposição para colonização por fungos devido ao extenso dano pulmonar e terapias com antibióticos por períodos prolongados, usualmente se encontram dentro das vias aéreas, ocasionalmente como bolas fúngicas intracavitárias (Maguire et al., 1995; Bhargava et al., 1989). Microscopicamente, aparece infiltração eosinofílica das paredes dos brônquios, descamação do epitélio, espessamento da membrana basal e tampão mucoso, contendo grande quantidade de eosinófilos e cristais de Charcot Leyden. Nos casos de bronquiectasias coexistentes aparece o tampão de muco característico assim como a inflamação e destruição da parede brônquica com infiltrado eosinofílico proeminente. Granulomatose broncocêntrica representa uma hipersensibilidade mais profunda com reação em paliçada de células epitelióides, células gigantes de Langhans e muitos eosinófilos cercando e infiltrando os brônquios. Quando o padrão inflamatório se estende para as pequenas vias aéreas e alvéolos, surge um padrão semelhante à pneumonia eosinofílica. O aumento do uso de estratégias imunossupressivas e terapias agressivas antipseudomonas, tem ocasionado um aumento na doença pulmonar por *Aspergillus*, incluindo aspergilose invasiva (Sheppard et al, 2002).

Vírus respiratórios são importantes patógenos em pacientes com FC. Infecções por vírus como o Vírus Respiratório Sincicial (VRS), Vírus influenza, vírus parainfluenza, adenovírus e rinovírus tem um período de incubação relativamente pequeno (menor que uma semana), e a transmissão ocorre primariamente via direta por contato com pessoas infectadas. As partículas virais entram nas membranas

mucosas dos olhos e narinas de pacientes suscetíveis e se multiplicam no epitélio respiratório, subseqüentemente reduzindo o movimento ciliar e aumentando a produção de muco. Crianças com FC não são mais suscetíveis a infecções que seus irmãos sem FC ou controles. Infecções do trato respiratório inferior, hospitalização e redução da função pulmonar pode predispor a pacientes com FC á infecção bacteriana (Saiman et al., 2004).

O papel de micobactérias não tuberculosa causando infecção e dano nos pulmões de pacientes com FC tem sido recentemente destacado assim como infecção por clamídias (Sheppard et al., 2002).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A FC é uma exocrinopatia difusa cujas primeiras características clínicas foram descritas por Andersen em 1938 e em função destas características clínicas relatadas principalmente pelo seu efeito na função pancreática a doença veio a ser conhecida como “fibrose cística do pâncreas”. Neste período era considerada uma doença rara afetando somente crianças, manifestando principalmente por redução da função pancreática e de evolução fatal. (Nolan et al.,1976).

O espectro fenotípico associado com mutações no gene *CFTR*, se estende para além do definido classicamente nos casos de FC, pois tem sido observado um grande número das chamadas doenças monossintomáticas, como as várias formas de azoospermia obstrutiva, pancreatite idiopática e bronquiectasias disseminadas que estão associadas com mutações no gene *CFTR* não características da FC (Sheppard et al, 2002).

O espectro clínico de FC é muito variável e de complexa compreensão. A doença pode ocorrer em adolescentes ou adultos que tiveram mínimos ou nenhum sintoma na infância (Plant et al., 2013). Muitos pacientes são diagnosticados na idade adulta e os médicos clínicos de adultos não familiarizados com a doença desconhecem que sintomas de FC podem aparecer nesta idade (Nolan et al.,1976).

A maioria dos pacientes apresenta uma doença pulmonar crônica e insuficiência pancreática, onde 20% dos pacientes são capazes de digerir normalmente e absorver gordura, porém com risco para pancreatite recorrente. Nesse grupo de fibrocístico, pancreatite é freqüentemente a apresentação clínica que leva ao diagnóstico da doença, sendo tipicamente diagnosticados com FC tardiamente na infância, pois cursam com clínica mais branda e usualmente falta a doença sino pulmonar. A incidência de sintomática pancreatite em pacientes com FC varia de 1-2%. Uma minoria de pacientes com FC (13-15%) expressa o fenótipo pancreático suficiente (Conklin L. et al., 2008; Mascarenhas et al, 2008).

As manifestações gastrointestinais da FC são muitas sendo as mais comuns: IP, íleo meconial, DIOS, refluxo gastroesofageano e doença hepática. A maioria dos pacientes com FC com IP apresentam sintomas de má absorção de proteínas, gorduras e hidratos de carbono como: esteatorréia, perda ponderal progressiva, distensão abdominal e falha no crescimento. Pacientes que apresentam IP tendem a evoluir com doença hepática mais grave, doença pulmonar, e desnutrição (Raymond et al., 2000; Mascarenhas et al, 2008). A desnutrição na FC se não tratada precocemente pode contribuir para o atraso puberal e deficiências nutricionais específicas comprometendo a imunidade com conseqüente agravo da doença respiratória (Zemel et al., 1996). Estado nutricional preservado está associado ao aumento da sobrevivência dos pacientes com fibrose cística. Nos Estados Unidos, 20% das crianças e adolescentes apresentam o peso e a estatura abaixo do percentil 5; e no Reino Unido apesar da melhora no perfil nutricional das crianças com FC nas últimas décadas, uma parcela ainda persiste com peso e estatura muito aquém do esperado para idade. Contudo em países subdesenvolvidos parece haver uma sobreposição de desnutrição primária e secundária nestes pacientes (Rosa et al., 2008).

A dor abdominal nas crianças com FC pode se assemelhar às doenças comuns nas crianças da mesma faixa etária com infecção intestinal, intolerância e/ou alergia á proteína do leite, trauma entre outros. A prevalência de dor abdominal recorrente difere com o modo de apresentação: íleo meconial (38%), má absorção (47%) e refluxo gastroesofágico (32%). Condições cirúrgicas como apendicite, vólculo, intussuscepção podem ocorrer. Pacientes com esplenomegalia podem

apresentar infartos locais que provocam dor no abdome superior esquerdo (Littewood, 1995).

A hepatopatia é encontrada em 1,4% a 7,0% dos pacientes fibrocísticos e geralmente é assintomática. A doença hepática ocorre em pacientes com idade média de 10 anos, prevalecendo no sexo masculino (Sheppard et al, 2002, Knowles et al., 2012). Doença hepática é a segunda causa de morte em FC. É estimado que 40% dos pacientes com FC desenvolvam doença hepática, mas somente 1 a 5% destes casos progredam para hipertensão portal e estágio final de doença hepática (Robertson et al., 2006).

O Íleo Meconial é a causa mais comum de obstrução intestinal em recém-nascidos com FC, ocorrendo em 20% dos neonatos com FC (Mascarenhas et al., 2008, Daniel et al., 2013). Resulta de formação de mecônio espesso no intestino delgado e geralmente está associado á distensão abdominal e presença de dilatação de alças intestinais visualizadas nos exames de imagem. Aproximadamente 50% dos casos complicam com peritonite e perfuração intestinal. O prolapso retal ocorre tipicamente em crianças com idades entre seis meses a três anos de idade e resulta de desnutrição, má absorção e baixo tônus muscular com eliminação de fezes diarréicas e volumosas. Outros achados menos comuns na infância são: edema por hipoproteinemia, hipocalemia, alcalose metabólica hipoclorêmica, icterícia neonatal prolongada secundária á estase de bile intra- hepática (Paranjape et al., 2008).

DIOS (“Síndrome da obstrução do Intestino Distal”) chamado de íleo meconial equivalente, é uma recorrente variável de obstrução intestinal iniciando na região ileocecal e estendendo através do cólon, causando dor abdominal aguda ou recorrente no FC, ocorre em 10 a 47% dos pacientes, sendo mais freqüente naqueles onde a má absorção intestinal não está controlada (Littewood, 1995; Mascarenhas et al., 2008; Daniel et al., 2013).

Adolescentes e adultos jovens podem desenvolver episódios agudos, isolados ou repetidos de pancreatite, podendo ser acompanhado por dor intensa abdominal, náuseas, vômitos, alteração do estado geral, elevação dos níveis séricos de enzimas pancreáticas e alterações radiológicas. Acomete em geral o grupo de pacientes que cursam com suficiência pancreática, embora possa ocorrer entre os pacientes com

insuficiência pancreática; numa prevalência menor que 2% (Kelles et al., 2006; Wendy et al., 2009; Aguirre et al., 2011).

Estudos estimam que o predomínio de *diabetes mellitus* em pacientes com fibrose varia de 2,5% a 12,0%, aumentando consideravelmente com a idade. Na Dinamarca, 32,0% dos pacientes com fibrose cística desenvolveram *diabetes mellitus* por volta dos 25 anos de idade. Ocorre por redução de secreção de insulina por redução das células Beta do pâncreas. Resistência á insulina é comum e raro a ocorrência de Cetose (Rosa et al., 2008; Knowles et al, 2012; Plant et al., 2013).

Doença respiratória é a maior causa de morbidade e mortalidade na FC. Indivíduos afetados têm infecção endobrônquica crônica, acompanhada de intensa resposta inflamatória e obstrução das vias aéreas. Manifestações precoces são: tosse crônica, produção intermitente de escarro e dispnéia. Com a evolução da doença, ocorre progressiva lesão estrutural resultando em bronquiectasias com aparente função normal (Moskowitz et al, 2008). Bronquiectasias aumentam em gravidade com a idade. Alterações nos brônquios e bronquiectasia foram vistas ao nascimento e ficaram mais comuns com o avançar da idade. Esse processo afeta as vias aéreas proximais e a distribuição é usualmente mais marcada nos segmentos superiores dos lobos , lobo médio direito, língula e segmentos de lobos inferiores. O estágio final da doença pulmonar é caracterizado por extenso dano, formação de cistos, abscessos com fibrose do tecido adjacente (Mascarenhas et al., 2008; Moskowitz et al, 2008). As vias aéreas superiores estão frequentemente envolvidas na FC com pólipos nasal sendo encontrada em todas as idades, sua incidência na criança varia de 6,7% a 20%, enquanto nos adultos pode chegar a 40%. A presença de pólipos nasal na infância sugere FC e estão associados com queixa de obstrução nasal e sinusopatia (Sheppard et al., 2002).

Com o aumento da idade, a doença pulmonar se apresenta mais avançada e seqüelas importantes ocorrem nos adultos incluindo hemoptise, pneumotórax e exacerbações pulmonares. As exacerbações pulmonares são eventos clinicamente importantes em pacientes com FC, pois estão associados com redução da qualidade de vida e sobrevida. A despeito do tratamento agressivo com antibióticos intravenosos direcionados ás infecções das vias aéreas, um quarto dos pacientes diagnosticados com exacerbação não recupera a função pulmonar para a sua função

basal prévia á exacerbação, sugerindo que exacerbações podem levar para dano irreversível dos pulmões (Flume, 2009; Quon et al, 2014). O diagnóstico precoce, tratamento de exacerbações e o uso de terapias por longos períodos têm melhorado a sobrevida de pacientes com FC. Contudo a história natural da doença das vias respiratórias da FC leva para a progressão da lesão com evolução para bronquiectasias, levando eventualmente á falência respiratória (Flume, 2009).

Outros achados têm sido significativos nos pacientes adultos como um crescente número de indivíduos com doença de fenótipo não clássico apresentando manifestações clínicas mais brandas. Dois grupos de pacientes adultos são reconhecidos: um grupo que teve o diagnóstico precoce e outro com diagnóstico tardio (média de diagnóstico de 49 anos). Aqueles que tiveram diagnóstico tardio predominam o sexo feminino e tem uma mais baixa prevalência de insuficiência pancreática, um menor grupo com infecção crônica por *Pseudomonas aeruginosa* e uma maior proporção de infecções por micobactéria não tuberculosa que aqueles com diagnóstico precoce (Plant et al 2013).

A maioria dos pacientes com FC estão alcançando a idade adulta, assim a coexistência de doença extrapulmonar tem sido mais comum. Mais de quarenta por cento dos pacientes são adultos e as queixas apresentadas variam amplamente. Uma recente visão retrospectiva tem mostrado que 7% dos FC não alcançam a idade adulta, e somente 39% destes pacientes tem sintomas pulmonares como sua única queixa. Quando os pacientes são diagnosticados na idade adulta, 26% apresentam sintomas gastrointestinais no momento de procura do centro de FC, e 4% tinha pancreatite como única manifestação (Gilljam et al.,2004).

Em populações com elevada heterogeneidade, a análise de associação entre marcadores polimórficos e lócus *CFTR* pode mostrar informações sobre mutações causando doenças e pode indiretamente acompanhar a detecção de portadores para diagnóstico de FC (Cabello et al.,2006).

Os avanços diagnósticos e terapêuticos na FC são responsáveis pelo aumento da expectativa de vida, que em 1970 era de 16 anos e que atualmente circunda os 40 anos. Nos EUA, 46% destes doentes são mulheres em idade adulta que desejam em sua maioria constituir família (Budey et al., 2005). Contudo pouco

se sabe sobre o real risco de uma gestação em pacientes com FC, particularmente naquelas com pior função pulmonar (Goss et al, 2003). Algumas pacientes podem apresentar problemas com infertilidade, provavelmente pela aumentada viscosidade do muco cervical e desnutrição aliada doença respiratória grave. É freqüente o atraso puberal, irregularidade menstrual, problemas com a ovulação e aumento do risco para vulvovaginites (McMullen et al., 2006). Um estudo escandinavo em 61 pacientes femininas em idade reprodutiva mostrou que 75% conseguiram engravidar, sendo que 85% de forma espontânea e 15% por reprodução assistida, evoluindo a maioria para parto normal a termo, sem complicações no pós-parto e bebês com peso adequado para a idade gestacional. Odegaard et al. (2002), acompanhou 33 gestações de 23 pacientes com FC e observou que 24% foram de partos pré-termos e associou com doença respiratória moderada a grave das gestantes e 79% das crianças foram amamentadas. Sugeriu que a gestação em FC precisa de maior controle das intercorrências respiratórias para que a gestação transcorra com segurança e observou maior longevidade entre as pacientes que engravidaram quando comparadas com as demais pacientes. Gestações em pacientes que receberam transplante pulmonar podem evoluir com sucesso, embora haja considerado risco de rejeição e de óbito após o parto, sendo aconselhável que as pacientes estejam estáveis clinicamente antes de considerar a gravidez (Gyl et al, 2006).

Agnesia congênita de ductos deferentes (CBAVD) é responsável por 2 a 6% da infertilidade masculina onde mutações no gene *CFTR* têm sido identificadas. CBAVD é uma característica comum em homens com FC (Radpour et al., 2006; Du et al., 2014).

Apresentações atípicas conhecidas como “Fibrose Cística Atípica” ou não clássica tem uma apresentação clínica diferente, pois em geral cursa com suficiência pancreática, bronquite leve, polipose nasal, CBAVD e teste do suor limítrofe (Bronsveld et al, 1999). Ocorre em aproximadamente 2% dos FC e pode se manifestar como uma enfermidade monossintomática. Os critérios diagnósticos ainda não estão claros, mas o encontro de duas mutações no gene *CFTR* confirmam o diagnóstico na ausência de encontro de alterações nos meios que investigam a condutância do cloro (Teste do Suor, DPN) (Paranjape et al., 2012). Estes pacientes tendem a ser SP e podem manifestar episódios, isolados ou repetidos de

pancreatites. A FC atípica se caracteriza pela presença de mutações leves, com variado comprometimento da função pulmonar e sintomatologia em outros órgãos, que finalmente conduzem ao diagnóstico. Neste grupo a média de idade ao diagnóstico e de sobrevida em geral é superior a da forma clássica da enfermidade de início na infância (Aguirre et al., 2011; Paranjape et al., 2012).

Lesão renal aguda é comum nos FC, com frequência estimada de 4,6 a 10 casos por 10.000 crianças com FC, uma incidência 100 vezes maior que na população geral. Pacientes com lesão renal aguda geralmente foram expostas tratamento com drogas como aminoglicosídeos. Outros fatores de risco incluem a doença renal congênita, desidratação e uso de drogas nefrotóxicas como os antiinflamatórios. Cálculo renal ocorre em 3-6% de pessoas com FC, ocorrendo numa frequência três vezes maior nestes pacientes que em controles normais. Sua origem parece estar associada a vários fatores entre eles a reduzida produção de urina, hipocitratúria e hiperoxalúria absorptiva. Doença renal crônica é uma complicação mais comum entre os adultos com FC, com aumento da prevalência a cada 10 anos de vida e em pacientes com CFRD. Doença renal crônica em pacientes com FC está associada com o aumento da idade, sexo feminino e baixa função pulmonar. Microalbuminemia ocorre em 6% dos FC sendo a maioria pacientes com diabetes e transplantados (Plant et al., 2013).

Osteopenia e osteoporose vêm ganhando importância em números absolutos à medida que o número de adultos com FC aumenta. As causas são multifatoriais e incluem insuficiência pancreática exócrina, insuficiência de vitamina D, vitamina K e cálcio; inadequada reserva de massa óssea em adolescentes e adultos jovens, infecções recorrentes com estímulo de citocinas, reabsorção óssea osteoclasto mediada, inatividade física e CFRD. Há um aumento na incidência de fraturas, sendo as fraturas vertebrais as mais comuns (quase exclusivamente torácica), reforçando a importância da triagem e tratamento da osteoporose. Hipocratismo digital é um achado freqüente em pacientes com infecção pulmonar supurativa crônica. Mais de 15% dos FC maiores de 12 anos podem desenvolver osteoartropatia hipertrófica pulmonar envolvendo o terço distal do fêmur, fíbula, rádio, ulna e úmero. Menos de 10% desenvolvem artrite mono ou poliarticular afetando joelhos e tornozelos (Moskowitz et al, 2008, Plant et al.,2013).

Em pacientes com FC, estudos mostraram um aumento no risco de câncer gastrointestinal comparado com população saudável, e o risco de câncer aumenta com a idade. O aumento de risco esteve associado com cânceres detectados no intestino delgado, pâncreas e trato biliar (Durie, et al.,1989., Plant, et al.,2013).

2.6 DIAGNÓSTICO

Compreensão da fisiopatologia da FC e melhora dos cuidados multidisciplinares em centros especializados tem resultado em melhor qualidade de vida e longevidade. O curso natural da doença pulmonar na FC, que resulta na falência pulmonar e morte, pode ser retardado, mas não prevenido. O tratamento é muitas vezes adiado até o surgimento dos primeiros sintomas, quando lesão pulmonar já existe. Triagem neonatal por dosagem de tripsina imunorreativa (TIR) para FC tem sido implantada em vários países do mundo, incluindo Brasil (Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry Annual Report, 2011), e pode identificar os pacientes em indivíduos antes que os sintomas respiratórios apareçam. Esta forma de diagnóstico da doença tem oferecido novas oportunidades de intervenção precoce (Grasemann et al., 2013). Triagem neonatal para FC em várias regiões do mundo, usa um método que é feito duas etapas. A primeira é a dosagem da tripsina imunorreativa (TIR) e a segunda quando os níveis se encontram elevados da TIR (>70ng/L) a análise de DNA para investigação da mutação p.F508del (Castellani et al.2009). Apesar da atraente estratégia diagnóstica, a triagem neonatal usando o modelo TIR/DNA não alcança boa sensibilidade na maioria das regiões quando a investigação de DNA se limita a esta mutação (Bodadilla et al.,2002).

O diagnóstico de fibrose cística normalmente é estabelecido em indivíduos com uma ou mais características fenotípicas de FC mais a detecção de uma anormalidade na função da CFTR, baseada na presença de duas mutações no gene *CFTR* ou duas dosagens quantitativas por iontoforese por pilocarpina anormais de cloretos no suor (Teste do Suor com valores iguais ou superiores a 60mEq/L) ou pela medida da diferença de potencial nasal transepitelial (NPD) (Moskowitz et al., 2008). O teste do suor através da iontoforese por pilocarpina é o padrão áureo para a

confirmação do diagnóstico de FC. Dois métodos são descritos: o método Gibson & Cooke e coleta pelo sistema Macroduct (Dalcin et al., 2008).

A determinação da diferença de potencial nasal transepitelial (DPN) em muitas ocasiões tem contribuído para esclarecer o diagnóstico de fibrose cística atípica. O epitélio respiratório regula o transporte de íon e altera o conteúdo líquido da superfície das vias aéreas por mecanismos de transporte ativo. A ausência de função da proteína CFTR da superfície apical resulta em alterações do efluxo de cloro e produz um transporte de sódio gerando uma diferença de potencial nasal anormal através da superfície do epitélio (Karczeski et al., 2006; Paranjape et al., 2008).

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado por coleta de espécime de vilosidade coriônica do útero de gestantes para busca de mutações no gene *CFTR*. A presença de duas mutações causando doença no gene *CFTR* é consistente com FC (Karczeski et al., 2006). Em 2002, 4% de indivíduos diagnosticados precocemente foram identificados pelo diagnóstico pré-natal (Moskowitz et al., 2008).

Painéis de análise genética para a identificação de duas mutações causando a doença FC em *trans*, devem ter uma taxa de detecção de mutação superior a 95%, mas a heterogeneidade da mutação *CFTR* em várias populações faz este alvo extremamente desafiante usando técnica molecular corrente (Castellani et al., 2008). Existe uma diferença na prevalência da mutação no gene *CFTR* em indivíduos de várias etnias e regiões demográficas. A grande heterogeneidade étnica da população e crescente miscigenação dificultam o desenvolvimento de painéis apropriados para diagnóstico genético (Bodadilla et al., 2002).

2.7 TRATAMENTO

Quando a doença foi descrita pela primeira vez por Andersen em 1938, apresentava êxito letal no primeiro ano de vida, porém ao longo dos anos a aquisição de conhecimento sobre a fisiopatologia e avanços na abordagem terapêutica como a introdução de novas drogas, Centros de Assistência

Especializados com equipe multidisciplinar treinada, suporte nutricional aliado ao uso intensivo de antibióticos; vem alterando o perfil clínico dos pacientes FC nas últimas décadas (Mahadeva et al. 1998; Moss, 2002).

A insuficiência pancreática pode ser detectada através da pesquisa de gordura nas fezes de 72 horas (perda de mais de 7 gramas por dia) e medida de elastase fecal (< 200mg/g de fezes). Elastase fecal é inicialmente baixa em recém-nascidos, mas alcança níveis de adulto com duas semanas de vida independente da idade gestacional. A terapia de reposição enzimática é padrão para pacientes com IP, devendo ser aliado a uma dieta apropriada e suplementação de vitamina (Lohr et al., 2009; Stallings et al., 2008). Devido à anormalidade da proteína CFTR no transporte alcalino duodenal e secreção pancreática de bicarbonato, o pH duodenal é mais baixo em FC que controles normais, potencialmente afetando a ativação de ambos as enzimas pancreáticas endógenas e exógenas. Tratamento com um inibidor de bomba de próton tem mostrado melhorar a digestão de gorduras e absorção em crianças com FC, quando há persistência de má absorção apesar do uso da reposição de enzimas pancreáticas (Mascarenhas et al., 2008).

Na presença de pancreatite o manejo dos pacientes deve ser direcionado para adequada analgesia, acompanhamento em longo prazo para monitoramento da insuficiência pancreática com reposição enzimática se necessário e tratamento do diabetes quando presente (Nydegger et al., 2006).

Criança com FC tem um aumento do requerimento de energia quando comparada com crianças saudáveis, com necessidades calóricas em torno de 120% a mais. O uso de suplementos nutricionais isoladamente por via oral pode ser ineficaz para garantir as necessidades do FC. Mudanças de hábitos alimentares podem ser necessários para melhor controle do ganho ponderal e melhor desempenho estatural. O monitoramento dietético e suplementações quando necessárias podem melhorar o desempenho respiratório e a qualidade de vida (Abbott et al, 2003).

Com o aumento da sobrevida, a FC tem se transformado de uma doença infantil com elevada mortalidade para uma doença que agora é considerada uma doença respiratória crônica. Exacerbações pulmonares ocorrem duas a três vezes ao ano e se apresentam clinicamente com piora da tosse e mudança do escarro, com

aumento da dispnéia, redução do apetite, perda de peso e queda dos índices espirométricos. Exacerbações pulmonares estão associadas com aquisição de novos microorganismos ou mudança da densidade de colonização do trato respiratório (Goss et al., 2009).

A antibioticoterapia é um aspecto fundamental no tratamento da FC, pois reduz o impacto da doença pulmonar produzido pelas sucessivas infecções e melhora a sobrevida. A escolha do antibiótico se faz diante da análise quantitativa e qualitativa da flora da expectoração, dos fenótipos de resistência dos microorganismos observados nas culturas periódicas. Os antibióticos então deverão ser meticulosamente selecionados, podendo ser administrados via oral, intravenosa e inalatória, por período de tempos variáveis atendendo às necessidades individuais e do momento (Sermet- Gaudelus et al., 2000).

Agentes mucolíticos, reduzem a elasticidade e viscosidade do muco sendo usados para melhorar o clearance e melhorar a viscoelasticidade do muco. Eles melhoram a função pulmonar e reduzem o número de exacerbações (Dalcin et al., 2008; Borowitz et al., 2009; Grasemann et al,2013).

A maioria dos Centros introduz a fisioterapia para melhorar o clearance das vias aéreas precocemente logo após o diagnóstico antes dos sintomas respiratórios se fazerem presentes. Porém esta medida não mostrou evidências de eficácia em crianças muito pequenas, pois foi observado aumento refluxo gastroesofageano nas mesmas, contudo em crianças maiores e adultos a fisioterapia tem revelado ser útil para higiene brônquica (Grasemann et al., 2013).

Vigilância da doença pulmonar é útil para acompanhar a evolução da doença respiratória, deve ser periódica e condicionada á gravidade clínica dos pacientes. Controle microbiológico de escarro deve ser realizado a cada consulta para monitoramento da cronicidade da infecção ou identificação de novos microorganismos que contribuirão para as estratégias terapêuticas (Tiddens et al., 2002; Borowitz et al., 2009; Oliver et al., 2009).

A gravidade da doença respiratória é o fator isolado mais importante, afetando a sobrevida desses pacientes. A progressão da doença é avaliada pela medida da função pulmonar através da capacidade vital forçada (CVF), do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e do fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF (FEF25-75), exames de imagem e por dados clínicos. (Borowitz et al., 2009) A medida da função pulmonar é tecnicamente difícil em crianças com idade inferior a cinco anos. (Tiddens et al., 2002) A radiografia de tórax tem sido o primeiro método diagnóstico de imagem na avaliação do comprometimento pulmonar e é adequada para detectar as lesões mais significativas. Tomografia de tórax pode identificar lesões como bronquiectasias antes de serem perceptíveis ao Rx simples de tórax (Borowitz et al., 2009; Abram et al., 2008; Freire et al., 2008).

Tiddens et al., (2002), observaram que parâmetros da prova de função pulmonar se correlacionam negativamente com os achados radiológicos, pois a maioria dos pacientes apresenta função pulmonar normal apesar do progressivo dano estrutural. Estudos morfológicos mostraram que anormalidades são mais graves na periferia que nas vias aéreas centrais e que tomografia computadorizada do tórax é o método mais sensível para detectar anormalidades estruturais que o Rx de tórax e que testes de função respiratória são uma medida indireta para medida de integridade estrutural e são insensíveis para localizar a lesão precocemente.

A oximetria de pulso é um método não invasivo para avaliar a oxigenação. Rx de tórax deve ser feito anualmente, ele pode detectar anormalidades ou mudanças sutis de imagem no decorrer da doença que podem ser mensuradas através de escore padronizado (Borowitz et al., 2009). O escore de Brasfield (Quadro 1) tem sido correntemente usado para esse fim (Abram et al., 2008; Freire et al., 2008).

Quadro 1. Escore Radiológico de Brasfield. *

Aprisionamento aéreo	Distensão pulmonar generalizada com convexidade esternal, depressão do diafragma e/ou cifose torácica	0 ausente 1 a 4, conforme a intensidade
Acentuação das imagens brônquicas	Densidades lineares em decorrência da dilatação brônquica, paralelas ou entrecruzadas Opacidades circulares com espessamento da parede brônquica	0 ausente 1 a 4, conforme a intensidade
Lesões cístico-nodulares	Opacidades arredondadas, pequenas e múltiplas = ou > 0,5 cm, com centros radiopacos ou radiolucidas	0 ausente 1 a 4, conforme a intensidade
Grandes lesões	Atelectasias lobares ou segmentares; ou consolidação; inclui pneumonia	0 ausente 3 atelectasia lobar/segmentar 5 atelectasias múltiplas
Gravidade geral	Impressão da completa gravidade das alterações radiológicas	0 ausente 1 a 4, conforme a intensidade 5 complicações cardiomegalia/pneumotórax

* Fonte: J Bras Pneumol 2008; 34 (5): 280-287

Para melhor monitoramento da doença pode-se correlacionar os métodos da função pulmonar, dos exames de imagem e de dados clínicos em um escore. Inúmeros sistemas de escores têm sido utilizados para classificar a gravidade da doença pulmonar de forma mais objetiva, sendo o escore clínico de Shwachman-Kulczycki aliado ao escore radiológico de Brasfield amplamente empregados. Há inúmeros relatos na literatura de correlações entre esses escores e função pulmonar (Freire et al., 2008). Para o Escore de Shwachman-Kulczycki. (Quadro 2) Quanto maior a pontuação melhor a condição clínica do paciente (Abram et al., 2008).

Quadro 2. Escore de Shwachman-Kulczyki. *

Gradação	Pontos	Atividade geral	Exame físico	Nutrição	Achados radiológicos
Excelente (86-100)	25	Atividade íntegra. Brinca, joga bola. Vai à escola regularmente, etc.	Normal. Não tosse. FC e FR normais. Pulmões livres. Boa postura.	Mantém peso e altura acima do percentil 25. Fezes bem formadas. Boa musculatura e tônus.	Campos pulmonares limpos.
Bom (71-85)	20	Irritabilidade e cansaço no fim do dia. Boa frequência na escola.	FC e FR normais em repouso. Tosse rara. Pulmões livres. Pouco enfisema.	Peso e altura entre percentis 15-20. Fezes discretamente alteradas.	Pequena acentuação da trama vasobrônquica . Enfisema discreto.
Médio (56-70)	15	Necessita repousar durante o dia. Cansaço fácil após exercícios. Diminui a frequência à escola.	Tosse ocasional, às vezes de manhã. FR levemente aumentada. Médio enfisema. Discreto baqueteament o de dedos.	Peso e altura acima do 3º percentil. Fezes anormais, pouco formadas. Distensão abdominal. Hipotrofia muscular.	Enfisema de média intensidade. Aumento da trama vasobrônquica .
Moderado (41-55)	10	Dispneia após pequenas caminhadas. Repouso em grande parte.	Tosse frequente e produtiva, retração torácica. Enfisema moderado, pode ter deformidades do tórax. Baqueteament o 2 a 3+.	Peso e altura abaixo do 3º percentil. Fezes anormais. Volumosa redução da massa muscular.	Moderado enfisema. Áreas de atelectasia. Áreas de infecção discreta. Bronquiectasia .
Grave (40)	5	Ortopnéia. Confinado ao leito.	Tosse intensa. Períodos de taquipnéia e taquicardia e extensas alterações pulmonares. Pode mostrar sinais de falência cardíaca direita. Baqueteament o 3 a 4+.	Desnutrição intensa. Distensão abdominal. Prolapso retal.	Extensas alterações. Fenômenos obstrutivos. Infecção, atelectasia, bronquiectasia .

* Fonte: J Bras Pneumol 2008; 34 (5): 280-287

Novos tratamentos para a doença pulmonar estão em estudos clínicos e incluem as antiproteases, amiloride, bloqueadores do canal de sódio, DNase e terapia gênica. Os pulmões são considerados um órgão ideal para alvo terapêutico pelo fácil acesso, mas pesquisas subsequentes mostraram que a superfície das vias aéreas apresenta uma barreira eficiente para a transferência de agentes tópicos inalados. Um número de ensaios clínicos seguros foi desenvolvido nas décadas de 1990, oferecendo evidências conceituais que fornecimento de DNA tanto por meios virais ou não virais embora parecendo seguro, foi clinicamente ineficaz (Sheppard et al., 2002).

Outra estratégia de manejo investigada incluiu o desenvolvimento de pequenas moléculas dirigidas às mutações *CFTR*, conhecidas como moduladores *CFTR*. Recentemente, um destes moduladores, o potenciador *CFTR* ivacaftor, foi aprovado como terapia oral para pacientes com FC com a mutação p.G551D no gene *CFTR*. O desenvolvimento de ivacaftor não representa somente uma mudança no cuidado do FC, mas também serve como um notável exemplo de medicamento personalizado (Derichs, 2013).

Uma variedade de intervenções pulmonares tem mostrado estar associada com melhora da evolução da doença respiratória em crianças e adultos com FC entre eles: uso de dornase alfa, salina hipertônica a 7%, uso crônico de azitromicina. Contudo algumas precisam de mais estudos para avaliar o custo benefício de seu emprego: como uso de ibuprofeno, uso crônico de agonistas beta adrenérgicos, modificadores leucotrienos e corticóides inalados (Borowitz et al., 2009).

O tratamento de CFRD está associado com melhora da evolução clínica, incluindo função pulmonar e índice de massa corpórea. Cetoacidose é muito raro. Prova de tolerância á glicose é recomendada anualmente para os pacientes maiores de 10 anos de idade. Nos estágios iniciais de CFRD a dosagem de hemoglobina glicosilada e glicemia de jejum não oferecem sensibilidade como marcadores para detecção. O tratamento deve se por equipe multidisciplinar com foco na ingestão calórica adequada, exercício regular e insulina administrada de forma semelhante aos indivíduos com diabetes sem FC (Plant et al., 2013).

A combinação de estratégias de prevenção da doença osteoarticular é recomendada, incluindo o exame de densitometria óssea a partir dos 18 anos anualmente, suplementação de cálcio, vitamina D e vitamina K; estratégia para melhorar o estado nutricional, controle glicêmico nos diabéticos, tratamento agressivo das exacerbações pulmonares e exercício. Tratamento com difosfonato será necessário quando os escores de medida de massa óssea se mostrar limítrofes ou abaixo de esperado ou quando fraturas inesperadas ocorrem em pacientes esperando transplante pulmonar (Plant, et al.,2013).

Mais de um terço dos pacientes desenvolvem doença hepática manifestando como colangiopatia obstrutiva crônica, cirrose biliar focal e cirrose multilobular hepática. Doença hepática é difícil de ser detectada em estágio precoce por anormalidades laboratoriais. Falência hepatocelular é um evento raro e tardio. Tratamento com ácido ursodeoxicólico na dose de 20mg/kg/dia por tempo indefinido tem sido proposto (Mascarenhas et al., 2008).

Alergia aos antibióticos é um desafio comum no manejo de pacientes com FC. Um estudo na Austrália demonstrou que o risco de alergia aos antibióticos beta-lactâmicos aumenta com a idade e inclui gravidade da doença pulmonar e exposição repetida aos antibióticos. Outras classes de drogas também podem estar associadas às reações alérgicas. Antibióticos inalados podem estar associados à intolerância, especialmente em pacientes com grave obstrução do fluxo aéreo que podem resultar em tosse, hemoptise e mesmo broncoespasmo. O uso prolongado de aminoglicosídeos além de se associar à lesão renal, pode causar efeitos tóxicos otovestibulares, que são comuns entre os adultos com FC (Plant, et al.,2013).

O transplante pulmonar é uma importante modalidade de cuidado para pacientes em estado tardio da doença. Desde 2005, mais de 150 pacientes por ano receberam transplante de pulmão nos Estados Unidos. Com melhora na abordagem terapêutica, a função pulmonar no início da idade adulta também melhorou (média de FEV1 na idade de 18 anos foi 67% em 2000 e 78% em 2010) resultando em aumento da idade na qual os pacientes com FC recebem transplante pulmonar. Em 1995 a média de idade dos transplantados era de 25,6 anos; e no período de 2010 a 2012 a média de idade aumentou para 28,3 anos. CFRD está presente em 40% a 50% dos pacientes com FC no momento do transplante e sofrem um adicional de

risco de 20% para CFRD no pós-transplante (Bransveld et al., 1999; De et al., 2006; Plant et al., 2013; Hirche et al., 2014).

2.8 PROGNÓSTICO

Nos EUA a idade média de sobrevida aumentou de 28 anos em 1990 a 38 anos em 2010 desta forma, existe um número crescente de adultos sendo tratados em Centros especializados. O aumento da longevidade resultou em uma proporção de problemas médicos relacionados com a idade, modificando as necessidades e cuidados de assistência (Dalcin et al., 2011; Plant et al., 2013). Apesar dos avanços no diagnóstico e as estratégias terapêuticas desenvolvidas nos últimos 30 anos, 15% a 20% das crianças com FC morrem antes de completar 10 anos de vida (Rosa et al., 2008).

O prognóstico para pacientes com FC tem melhorado com as novas abordagens terapêuticas, melhor compreensão da fisiopatogenia da doença e novas gerações de antimicrobianos disponíveis para tratamento das infecções respiratórias, desta forma mais e mais pacientes sobrevivem até a idade adulta (Nolan et al., 1976, Hirche et al., 2014). Os pacientes diagnosticados na idade adulta tendem a apresentar uma doença com um fenótipo não clássico. Aos 40 anos de idade estes pacientes têm melhor função pulmonar que aqueles diagnosticados na infância; contudo a taxa média de declínio anual foi a mesma nos dois grupos após a idade de quarenta anos. O efeito do sexo na sobrevida difere pela idade de diagnóstico, mulheres diagnosticadas na idade adulta têm maior sobrevida que os homens, enquanto os homens diagnosticados na infância têm melhor sobrevida que as mulheres. Os indivíduos que sobrevivem por mais de quarenta anos provavelmente não são homocigotos para a mutação p.F508del. Pacientes que apresentam FEV1 menor que 30% do preditivo; a média de sobrevida sem transplante pulmonar variava de um a dois anos em 1992 e de três a cinco anos em um estudo feito em 2002. Apesar da melhora da abordagem da FC, a falência respiratória é a principal causa de morte nestes pacientes. Longevidade em pacientes com FC tem sido

associada com diagnóstico precoce e desenvolvimento de complicações (Flume, 2009; Plant et al., 2013).

Questões mais importantes que precisam ser endereçadas incluem o potencial papel das condições socioeconômicas e fatores ambientais na heterogeneidade de doença precoce na FC. Fatores ambientais incluindo acesso aos cuidados, variação na prática entre Centros, adesão ao tratamento e exposição para inalantes tóxicos como o cigarro, podem contribuir para a variabilidade da doença precoce na FC outros fatores de risco são idade de infecção por patógenos específicos e resposta para terapias específicas com antibióticos (MacNamara et al., 2009; Grasemann et al., 2013).

2.9 FIBROSE CÍSTICA NO BRASIL

O Grupo Brasileiro de Estudos em Fibrose Cística (GBEFC) foi criado em 2003, composto por profissionais da saúde comprometidos com a doença. Entre as atividades do GBEFC destacam-se a pesquisa, treinamento dos profissionais, auxiliar no desenvolvimento de tratamento dos Centros de FC, trabalhando junto ao Ministério da Saúde para definir um protocolo de cuidado de FC e de implantação da Triagem Neonatal. Esperado que até 2015 todos os estados na união já estejam com a triagem neonatal implantada.

O registro Brasileiro de FC de 2011 revelou que existem em tratamento no Brasil 2.182 pacientes com FC, onde 78,7% deles tinham idade inferior a 18 anos, entre eles 46% eram do sexo feminino e 54% são do sexo masculino. Prevaleceu a etnia branca (72%), seguida de mestiços (22%) e demais eram negros. A idade média ao diagnóstico foi de 5,75 anos, a maioria dos pacientes apresentavam sintomas respiratórios ao diagnóstico (64,5%), 40,2% dos pacientes apresentou desnutrição e a insuficiência pancreática com esteatorréia presente em 39%.

A maioria dos pacientes foi proveniente da região sudeste (50,3%), seguido pela região sul que contabilizou 25,2% , desta forma região sul e sudeste somaram com 75,5% do total de todos os pacientes presentes no registro. No Pará foram encontrados 2,5% dos pacientes contribuindo com a grande maioria (95%) dos

pacientes da região norte. Estudo genético foi realizado em 44% dos pacientes, destes 21,8% não se encontrou qualquer mutação. Homozigotos para a mutação p.F508del corresponderam a 26,8% e 42,2% heterozigotos (Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry 2011, Annual Report – www.gbefc.org.br).

Foram descritos 12 óbitos (0,8%) todos por doença respiratória. O escore de Schwchman- Kulczycki mostrou um valor médio na pontuação de 77,81.

Estes dados foram felizes em demonstrar a alta concentração dos pacientes diagnosticados e tratados em centros onde as condições socioeconômicas da população e o acesso da mesma aos meios de diagnósticos são bastante diferenciados aos daqueles das regiões norte e nordeste. Na região norte, muitos estados não fazem diagnóstico para FC e não oferecem tratamento especializado. Isso explica a divergência de dados locais com o global, a começar pelo padrão étnico populacional. Os estudos e registros apenas começaram e reconhecer as diversidades regionais pode ser um estímulo para que as ações tenham um maior alcance.

3 JUSTIFICATIVA

A FC é uma doença genética frequente, mas bastante heterogênea do ponto de vista clínico e laboratorial. Não somente a sua frequência, mas também a evidência de que o tratamento específico precoce melhora a qualidade de vida dos pacientes, fizeram a mesma ser incluída na maioria dos programas de triagem neonatal atualmente existente. Entretanto, devido à heterogeneidade alélica associada e às diferenças observadas na frequência dos alelos considerando diferentes populações, torna-se impossível a definição de um painel único para a triagem de mutações nessa doença. Dentro desse contexto, a FC está inserida entre as doenças triadas pelo programa público de triagem neonatal no Brasil, mas não existem estudos prévios caracterizando, tanto do ponto de vista clínico quanto molecular, os pacientes oriundos da região norte do país.

A gravidade e progressão da doença pulmonar na FC parecem ser moduladas por fatores genéticos. Estudos sugerem que a variante p.M470V afeta a intensidade da doença e a função de transporte de ânion da proteína CFTR. Conhecer a ação dos marcadores genéticos permitirá um melhor entendimento dos aspectos fisiopatológicos, da associação genótipo-fenótipo otimizando o tratamento da FC.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar do ponto de vista clínico e molecular uma amostra de pacientes com FC oriunda do Norte do Brasil e estabelecer uma possível relação entre as mutações não patogênicas do gene *CFTR* com a gravidade da doença respiratória.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Estabelecer a frequência de polimorfismo de nucleotídeo simples p.M470V na população de fibrocísticos de Belém-PA
- Compreender o impacto da variante p.M470V nas manifestações clínicas da FC

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot J, Gee L. Quality of life in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis. *Pediatr Drugs* 2003; 5 (1): 41- 56

Abram L, Adot F, Aguerre V, Agüero L, Altamirando M, Alvarez D, Andreatolla ME et al. Cystic Fibrosis: a Consensus Statement. *Arch Argent Pediatr* 2008; (Supl) 106(5): 01-52

Acton JD, Wilmot RW (2001) Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Paediatric respiratory reviews* 2: 332-339

Aguirre AS, Ezquerra MN, García CB, Novoc G, González SH, López-Manzanarese JM, García FB, Cordero CV. Pancreatitis en la fibrosis quística: correlación con el genotipo y estado pancreático. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 75(6):401- 408

Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H Analysis of the CFTR gene in Iranian cystic fibrosis patients: Identification of eight novel mutations. *J Cyst Fibros* 2007; 7 (2): 102-109

Andrezet MP, Dabricot A, Marechal C, Ferec C. Validation of High-Resolution DNA Melting Analysis for Mutation Scanning of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *Journal of Molecular Diagnostics* 2008; 10(5): 424-434

Angelicheva, D., Calafell, F., Savov, A., et al., Cystic Fibrosis Mutations and Associated Haplotypes in Bulgaria-A Comparative Population Genetic Study. *Hum. Genet.* 1997; 99:513-520

Aoyagi H, Okada T, Hasatani T, Mibayashi H, Hayashi et AL. Impact of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutation on the Occurrence of Chronic Pancreatitis in Japanese Patients. *The Journal of International Medical Research* 2001; 37: 378 – 384

Araujo, FG., Novaes, FC., Santos, NPC., Martins, VC., Souza, SM., Santos, SEB., et al. Prevalence of F508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz. J Med Biol Res* 2005 ; 38:11-15

Balci C. MRI assessment of chronic pancreatitis. *Diagn Interv Radiol* 2011; 17:249–254

Bhargava V, Tomaszewski J F J, Stern R C, Abramowsky C R. The pathology of fungal infection and colonization in patients with cystic fibrosis. *Hum Pathol* 1989; 20: 977- 986

Batsaks JG. Cystic Fibrosis and the sinusal tract. *Annals of otology, rhinology & laryngology* 1996; 105: 329- 330

Bergoin C, Gosset P. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis* 2002; 1:110-115

Bernadino ALF, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CEA, Nakaie CMA, Gomes CET, et al. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals novel mutations. *Genetic Testing*. 2000; 4 (1): 69-74

Bernardino ALF, Guarita DR, Mott CB, Pedrosa MRA, Machado MCC, Laudanna AA, Tani CM, Almeida FL, Zatz M. CFTR, PRSS1 and SPINK1 Mutations in the Development of Pancreatitis in Brazilian Patients. *JOP. J Pancreas (Online)* 2003; 4(5):169-177.

Berger H. A., Travis SM, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ClO channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 1993; 268:2037-2047

Bjarnsholt T, Jensen PØ, Jakobsen TH, Phipps R, Nielsen AK, et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. 2010 *PLoS One* 5: e10115

Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrell PM. Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations- Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 2002; 19: 575-606

Boyle MP. Strategies for Identifying Modifier Genes in Cystic Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 52 – 57

Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Girodon E, Sermetg I et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders *Journal of Cystic Fibrosis* 2011; 10: 86–102.

Borowitz DB, Robinson KA, Rosenfeld M, Davis SD, Sabadosa KA, Spear SL, Michel SH, Parad RB, White TB, Farrell PM, Marshall BC, Accurso FJ. Cystic Fibrosis Foundation Evidence-Based Guidelines for Management of Infants with Cystic Fibrosis. *The Journal of Pediatrics* 2009; 155 (6): S73-S93

Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry Annual Report, 2011 – www.gbefc.org.br

Bronsveld I, Bijman J, Ballmann M, Veeze H, Tümmler. Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1999; 54:278:281

Budev MM, Arroliga AC, Emery S. Exacerbation of underlying pulmonary disease in pregnancy. *Crit. Care.* 2005; 3 (10): 313-318

Cabello GMK, Cabello PH, Llerena J Jr, Fernandes O, Harris A. The 3120 +1G A Splicing Mutation in CFTR Is Common in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Hum Biol* 2001; 73:403-9.

Cabello GMK, Cabello PH, Lopez-Camelo JS, Llerena JC Jr, Fernandes O. Haplotype Distribution of and Linkage Disequilibrium Between Four Polymorphic Markers Near the CFTR Locus in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Human Biology* 2005; 77:853-65.

Cabello GMK, Cabello, P.H., Cabello, J.S., Fernandes O. O. Polymorphic Markers Suggest a Gene Flow of CFTR Gene from Sub-Saharan/Arabian and Mediterranean to Brazilian Population. *Journal of Heredity* 2006; 97(4):313-317

Callegari-Jacques, S. M., Tarazona-Santos, E. M., Gilman, R. H., Herrera, P., Cabrera, L., dos Santos, S. E.B., Morés, L., Hutz, M. H. and Salzano, F. M. Autosomal STRs in native South America—Testing models of association with geography and language. *Am. J. Phys. Anthropol* 2011; 145: 371–381. doi: 10.1002/ajpa.21505

Castellani C, Cuppens H, Macek MJ, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael MB, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrel P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwartz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis analysis in clinical practice. *J Cyst Fibrosis* 2008; 7(3): 179-196.

Castellani C, Southern KW, Browlee K, Dankert J, Duff Alistair, Farrel M, Munk A, Pollit R, Sermet-Gaudelus I et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *Journal of Cystic Fibrosis* 2009; 8: 153–173

Cebotaru L, Rapino D, Cebotaru V, Guggino BW. Correcting the Cystic Fibrosis Disease Mutant, A455E CFTR. *PLOS ONE* 2014; 9(1): 1-6

Chang YT, Chang MC, Su TC, Liang PC, Su YN, Kuo CH, Wei SC, Wong JM. Association of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mutation/Variant/Haplotype and Tumor Necrosis Factor (TNF) Promoter Polymorphism in Hyperlipidemic Pancreatitis. *Clinical Chemistry* 2008; 54:131–138

Chauhan S, Forsmark CE. Diseases of the Pancreas. *ACP Medicine.* 2009: 11-22

Chee YO, Dorfman R, Cipolli M, Gonska T, Castellani C, Keenan K, Freedman SD, Zielenski J, Berthiaume E Y, Corey M, Schibli S, Tullis E, Durie PR. Type of CFTR Mutation Determines Risk of Pancreatitis in Patients With Cystic Fibrosis. *Gastroenterology* 2011; 140:153–161

Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallart S, et al. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 1991; 10:1255-63

Cid R, Ramos MD, Luís Aparisi L, García C, Mora J, Estivill X, Farre´ F, Casals T. Independent Contribution of Common CFTR Variants to Chronic Pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 209- 215

Ciminelli, BM., Bonizzato, A., Bombieri, C., Pompei, F., C, Ciccacil, Gabaldo, M., et al. Highly preferential Association of NonF508del CF mutations with the M470 allele. *Journal of Cystic Fibrosis* 2007; 6:15-22

Cystic Fibrosis Analysis Consortium. Cystic fibrosis mutation database 2004. World Wide Web URL: <http://genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Claustres, M., Desgeorges, M., Moine, P., et al. CFTR Haplotype Variability for Normal and Mutant Genes in Cystic Fibrosis Families from Southern France. *Hum. Genet.* 1996; 948:336-344

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, SilvermJowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 653-658

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, and Paul S. Jowel L PS. Relation Between Mutations of the Cystic Fibrosis Gene and Idiopathic Pancreatitis. *The New England Journal of Medicine* 2013; 339 (10): 653-659

Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(6) 559-566

Conklin L, Zeitlin PL, Cuffari C. Cystic fibrosis presenting as recurrent pancreatitis in a young child with a normal sweat test and pancreas divisum: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2008, 2: 176

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. 2004. Cystic Fibrosis Mutation Database. Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Dalcin PTR, Ziegler B, Viana VP, Agostini GL, Pinhatti MM, Belloli LFS, Dal´Maso VB. Cystic Fibrosis: Ten-Year Analysis of a Coort of Adult Program. *Rev HCPA* 2011; 31(2):151- 159

De BK, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006; 61 (7): 627 – 635

De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E. Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. *Pediatrics* 2005; 115: 463–469.

Debray D, Kelly D, Houwen R, Strandvik B, Colombo C. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *Journal of Cystic Fibrosis* 2011; 10 (2):29-36

Delhaes L, Monchy S, Fre'alle E, Hubans C, Salleron J, et al. The Airway Microbiota in Cystic Fibrosis: A Complex Fungal and Bacterial Community—Implications for Therapeutic Management. *PLoS ONE* 2012; 7(4): e36313. doi:10.1371/journal.pone.0036313

Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, Georges MD, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwartz M, Girodon E. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics* 2009; 17:51-65

Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 2013; 22: (127): 58–65

Derikx MHM, Drenth JPH. Genetic Factors in Chronic Pancreatitis; implications for diagnosis, management na prognosis. *Research Clinical Gastroenterology* 2010; 24: 251-270

Desgeorges M, Demaille J, Mégarboné A, Carles S, Loiselet J, Guittard C, Claustres M. Cystic fibrosis in Lebanon : distribution of CFTR mutations among Arab communities 1997 ; 100 :279-283

De Vries, H., G., Van der Meulen, M., Rozen, R., et al., Haplotype Identity between Individuals Who Share a CFTR Mutation Allele "Identical by Descent": Demonstration of the Usefulness of Haplotype-Sharing Concept for Gene Mapping in Real Populations. *Hum. Genet.* 1996; 98:304-309

Döring G, Conway SP, Heijerman HGM. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: a European Consensus. *The European Respiratory Journal* 2000; 16: 751- 767

Drumm, ML., et al. Genetics modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1443- 1453

Du Q, Pan Y, Liu X, Pan B, Wu B. The CFTR M470V, Intron 8 Poly-T, and 8 TG-Repeats Detection in Chinese Males with Congenital Bilateral Absence of the vas deferens. *BioMed Research International* 2014; 2014:1-7

Durie, PR; Forstner GG. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society of Medicine Supplement* 1989; 16 (82):2-9

Faria EJ. Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: MBL 2, TGF- 1 e CD14 com a gravidade do quadro pulmonar na fibrose cística. Tese de Doutorado (UNICAMP) 2007

Fall A, Spencer D. Paediatric bronchiectasis in Europe: what now and where next? Paediatric Respiratory Reviews 2006; 7: 268- 274

Férec C, Scotet V, Corvol H. Genetic and modifier genes, atypical and rare forms. Arch Pediatr 2012; 19(1): 3-7

Flass T, Narkewicz MR. Cirrhosis and other disease in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis 2013; 12: 116- 124

Flume PA. Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. Respiratory Care 2009; 54(5): 618

FreireID, Silva FAA, Araújo MA. Comparison among pulmonary function test results, the Shwachman-Kulczycki score and the Brasfield score in patients with cystic fibrosis. J Bras Pneumol. 2008; 34(5):280-287

Friedman KJ, Heim RA, Knowles MR, Silverman LM. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene : association to the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. Hum Mutat 1997; 10: 108 -15

Gelfond D, Borowitz D. Gastrointestinal Complications of Cystic Fibrosis. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013; 11: 333- 342 Gilljam M, Ellis L, Corey M, Zielenski J, Durie P, Tullis DE. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. Chest 2004;126:1215–1224

Gyl KM, Hodson ME, Yacoub MY. Pregnancy in cystic fibrosis lung transplant recipients: case series and review. J Cyst. Fibros. 2006; 3: 171-175

Gimbovskaia SD, Kalinin VN, Ivashchenko TE, Baranov VS. Molecular –genetic analysis of certain mutations of the [quot] cystic fibrosis gene [quot] in Moldavia. Characteristics of molecular markers and their linkage with various mutations. Genetika 1994; 30 (12): 1616 – 20

Gyl KM, Hodson ME, Yacoub MY. Pregnancy in cystic fibrosis lung transplant recipients: case series and review. J Cyst. Fibros. 2006; 3: 171-175

Goss CH, Rubenfeld GD, Otto K, Aitken ML. The effect of pregnancy on survival in women with cystic fibrosis. Chest. 2003; 124(4): 1460-1468

Grasemann H, Ratjen F. Early lung disease in cystic fibrosis. Lancet Respir Med 2013; 1: 148- 157

Gross V, Schoelmerich J, Denzel K, Gerok W. Relapsing pancreatitis as initial manifestation of cystic fibrosis in young man with cystic fibrosis. *Int J Pancreatol* 1989;4:221-8

Haston, C K., and Hudson, TJ. Finding genetic modifiers of cystic fibrosis. *N Engl Med* 2005; 353:1509-1511

Hernández-Hernández F, Fréalle E, Carneiro P, Salleron J, Durand-Joly I, Accoceberry I, Bouchara JF, Wallaert B, Dei-Cas E, Delhaes L. Prospective Multicenter Study of *Pneumocystis jirovecii* Colonization among Cystic Fibrosis Patients in France. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 4107-4110

Hirche TO, Knoop C, Hebestreit H, Shimmin D, Solé A, Elborn JS, Ellemunter H, Aurora P, Hogardt M, Wagner TOF and ECORN-CF Study Group. Practical Guidelines: Lung Transplantation in Patients with Cystic Fibrosis Pulmonary Medicine 2014, Article ID 621342, 22 pages

Hoo AF, Thia LP, Nguyen TT et al. Lung function is abnormal in 3-month-old infants with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening. *Thorax* 2012; 67: 874881

Kammesheidt A. Identification of CFTR, PRSS1 and AAT mutations in 381 patients with pancreatic. *Pancreas*. 2006;33:221-7

Kapur N, Masters IB, Chang AB. Exacerbations in noncystic fibrosis bronchiectasis: Clinical features and investigations. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 1681- 1687

Karczeski BA, Cutting BR. Diagnosis of Cystic Fibrosis, CFTR-Related Disease and Screening. *Prog Respir Res*. Basel, Karger, 2006; 134: 69–76

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073 -1080

Kerem, E., Corey, M. Kerem, B., et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analyses of the most common mutation (Delta F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517 - 1522

Kelles SMS, Kammesheidt A. Identification of CFTR, PRSS1 and AAT mutations in 381 patients with pancreatic. *Pancreas*. 2006;33:221-7

Koch C. Early Infection and Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatric Pulmonology* 2002; 34: 232- 236

Knowles MR, Drumm M. The Influence of Genetics on Cystic Fibrosis Phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2:a009548

Korytina,G.F., Victorova,T.V., Ivashchenko, T.E., Baranov, V.S., Khusnutinova, E.K. Analysis of the Polymorphic Markers within the CFTR Gene in Cystic Fibrosis Patients an Healthy Donors from BashKortostan. Russian Journal of Genetics 39(11): 1306-1312 traduzido por Gentika 2003; 39(11): 1542- 1549

Lee,H.J., Choi,J.H., Namkung,W., Hanrahan, J., Chang,J., Song, S.Y., Park, S.W., Kim, D.S. et al. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. Human Molecular Genetics 2003; 12:2321 – 2332

Lindley KL. Chronic Pancreatitis. Indian Journal of Pediatrics. 2006; 73: 907-911

Littewood JM. Abdominal Pain in Cystic Fibrosis. J R Soc Med 1995; 25:9-17

Lyczac JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associates with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 194- 222

Lohr M, Hummel FM, Pirlis T. Properties of different pancreatin preparations used in pancreatic exocrine insufficiency. Eur J Gastroenterol Hepatol 2009; 21:1024-1031

Ma J, Tasch JE, Tao T, Zhao J, Xie J, Drumm ML, Davis PB. Phosphorylation-dependent block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by exoge nous R domain protein. J. Biol. Chem. 271: 7351–7356, 1996

Mahadeva R, Webb K, Westerbeek C, Carroll NR, Dodd EM, Bilton D, Lomas DA. Clinical outcome in relation to care in centres specializing in cystic fibrosis: cross sectional study. BJM 1998; 316:1771-1775

Mascarenhas M, Hsu E. Gastrointestinal Complications in Cystic Fibrosis Patients. U S Respiratory Disease 2008; 45:48

McMullen AH, Pasta DJ, Frederick PD, Konstan MW, Morgan WJ, Schechter MS, Wagener JS. Impact of pregnancy on women with cystic fibrosis. Chest. 2006; 129 (3): 706- 711

Maguire C P, Hayes J P, Hayes M, Masterson J, FitzGerald M X.Three cases of pulmonary aspergilloma in adult patients with cystic fibrosis. Thorax 1995; 50: 805 - 806

Manolio TA; Gutmacher, Alan E.; Manolio, Teri A. (julho de 2010). "Estudos de associação de doenças e a avaliação do risco de doença". N. Engl. J. med. 363(2) : 166-176.

Mariani A, Testoni PA. Is Acute recurrent pancreatitis a chronic disease? World J Gastroenterol 2008; 14:995- 998

Marson FAL, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interation of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. BMC Medical Genetics 2013; 14: 60

Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2013; 52 (2): 179 – 186

Mekitarian Filho E, Carvalho WB, Silva FD. Acute pancreatitis in pediatrics: a systematic review of the literature. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88(2):101-14

Mekus, F., et al. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotype characteristics. *Twin Res* 2000; 3: 277- 293

Milisevic K, Nikolik A, Rankov AD, Ljujic M, Nestoravic B, Radojkovic D. Analisis of CFTR Gene Variants in idiopathic Bronchiectasis in Serbian Children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2013; 26(2): 93-98

Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, et al. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1015-22

Morral, N., Bertranpetit, J., and Estivill, X., The origin of the Major Cystic Fibrosis Mutation (delF508) in European Populations. *Nat. Genet* 1994; 7: 169 – 175

Morral, N., Dork, Th., et al., Haplotype Analysis of 94 Cystic Fibrosis Mutations with Seven Polymorphic CFTR DNA Markers. *Hum. Mutat* 1996 ; 8: 149 – 159

Milisevic K, Nikolik A, Rankov AD, Ljujic M, Nestoravic B, Radojkovic D. Analisis of CFTR Gene Variants in idiopathic Bronchiectasis in Serbian Children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2013; 26(2): 93-98

Moskowitz SM, Chmel JF, Sternem DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and related disorders. *Genet Med* 2008; 10(12): 851- 868

Moss RB. Long term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis. *Chest* 2002;121:55-63

Mott LS, Gangell CL, Murray CP, Stick SM, Sly PD. Bronchiectasis in an asymptomatic infant with cystic fibrosis diagnosed following newborn screening. *Journal of Cystic Fibrosis* 2009; 8: 285-287

Mutesa L, Azad K, Verhaeghe C, Serges K, Vanbellinghen JF, Ngendahayo L, Rusingiza EK, Mutwa PR, Rulisa S, Koulischer L, Cassiman JJ, Cuppens H, Bours V. Genetic Analysis of Rwandan Patients with Cystic Fibrosis – like Syntoms. *Chest* 2009; 135: 1233- 1242

Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., et al., Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 1987; 235: 1616-1622

- Navarro HM, Kolbach MR, Repetto GL, Guiraldes EC, Harris PD, Foradori AC, Poggi HM, Sánchez ID. Correlation between phenotype and genotype in a group of patients with cystic fibrosis. *Rev. Méd. Chile* 2002;130 (5) :475-481
- Nydegger A, Couper RT L, Oliver M R . Childhood pancreatitis *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21: 499–509
- Ni WH, Jiang L, Fei QJ, Jin JY, Yang X, Huang XF. The CFTR polymorphism poly-T, TG-repeats and M470V in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Asian Journal of Andrology* 2012;14:687:690
- Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of Common CFTR Polymorphisms 5T, M470V, and R75Q in Healthy Serbian Population. *Russian Journal of Genetics* 2006; 42(7):821- 823
- Nolan AJ. Cystic fibrosis in adults: the unsuspect pulmonary diagnosis. *CMA Journal* 1976; 114:142-145
- Odegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrosten OT, Johannesson M. Maternal and Fetal morbidity in pregnancies of Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2002; 8: 698-705
- Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm Infeç Microbiol Clin* 2009; 27 (2): 89-104
- Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: New answers to old questions. *Proteomics* 2006; 6:4084-4099
- Oskooei KV, Pourbagher R, Larijani B, Niaki HA. IVS8 polyT and M470V polymorphism in healthy individuals and cystic fibrosis patients in Mazandaran province, Iran. *TUMJ* 2012; 69 (12): 761-767
- Paranjape SM, Zeitlin LP. Atypical Cystic Fibrosis and CFTR-Related Diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 35:116–123
- Pier GB. Rationale form Development of Immunotherapies that Target Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *Behing Inst Mitt* 1997; 98: 350-360
- Pompei, F., Ciminelli, BM., Bombieri, C, Ciccaccil, C., Koudova, M., Giorgi1, S., et al. Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 85-93

Plant BJ, Goss CH, Plant WD, Bell S. Management of comorbidities in older patients with cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 164- 764

Quon BS, Ngan DA, Wilcox PG, Man SFP, Sin DD. Plasma sCD14 as a Biomarker to Predict Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* 2014; 9(2):e89341. doi: 10.1371/journal.pone.0089341

Radpour R, Gilani MAS, Gourobi H, Dizoy AV, Mallamahamad S. Molecular analysis of the IVS8-T Splice variant 5T and M470V exon 10 missense polymorphism in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Molecular Human Reproduction* 2006; 12(7): 469- 473

Rajan S, Saiman L. Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect.* 2002; 17 (1): 47- 56

Ramírez AMO, Ramos MD, Jiménez J, Ghio A, Botelli MM, Rezzónico CA, Marqués I, Pereyro S, Casals T, Kremer RD. Mutation spectrum of cystic fibrosis patients and its zone of influence: Implications of molecular diagnosis in Argentina. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 87: 370- 375

Ramos MD, Masvidal L, Giménez J, et al. *CFTR* rearrangements in Spanish CF patients. First new duplication (35 kb) characterized in the Mediterranean countries. *Ann Hum Genet.* 2010;74:463–469

Raskin S, Phillips J A III, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rosov T, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie Cards. *Am J Med Genet* 1993; 46:665-9

Raskin S, Pereira L, Reis F, Rosario NA, Ludwing N, Valetim L, et al. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test Fall* 2003; 7:213-8

Raymond NC, Chang PN, Crow SJ, Mitchell JE, Dieperink BS, Beck MM, et al. Eating disorders in patients with cystic fibrosis. *J Adolsc.* 2000; 23(3): 359-63.

Ribeiro JD, Ribeiro MA, Ribeiro AF. Controvérsias na Fibrose Cística: do pediatra ao especialista. *J. Pediatr* 2002; 78(2): 171-186

Rich, D.P., Anderson, M.P, Gregory, R.J., Cheng, S.H, Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger.,K.W, Smith, A.E , Welsh, M.J. *Nature* 1990; 347:358 -363

Riordan, J. M., Rommens, J. M., Kerem, B., et al., Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, 1989; 245:1066 -1073

Robertson MB, Choe KA, Joseph PM. Review of the Abdominal Manifestations of Cystic Fibrosis. *RadioGraphis* 2006; 26:679-690

Rommens, J.M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., et al., Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* 1989; 245:1059-1065

Rosa FR, Dias FG, Nobre L N, Morais HÁ. Fibrose cística: uma abordagem clínica e nutricional. *Rev. Nutr.* 2008; 21 (6): 725-737

Rosendahl J, Bödeker H, Mössner J, Teich N. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet Journal of Rare Disease* 2007, 2:1

Rovedder PME, Ziegler B, Pasin LR, Pinotti AFF, Barreto SSM, Dalcin PTR. Chronic bacterial infection and echocardiographic parameters indicative of pulmonary hypertension in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2008; 34(7): 461-467

Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 352:1992-2001

Ruslan,D., Sandford,A., Taylo,C., Huang,B., Frangolias,D., Wnag,Y., Sang,R., Pereira,L., Sun,L., et.al. Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118:1040-1049

Rybtke MT, Jensen PØ, Høiby N, Givskov M, Tolker-Nielsen T, et al. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011; 10: 141–157.

Saiman L, Siegel J. Infection Control in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(1): 57–71

Santos C.I.S., Ribeiro J.R.,Ribeiro A.F., Hessel G. Análise Crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado de arte. *J Bras Pneumol* 2004; 30(3): 286-298

Sharer N, Schwarz M, Malone G et al. Mutations of cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998; 339:645- 652

Sheppard DN,. Welsh MJ. Structure and Function of the CFTR. Chloride Channel. *Physiological Reviews* 1999; 1(79): 23-45

Sheppard MN, Nicholson AG The pathology of cystic fibrosis. *Current Diagnostic Pathology* 2002; 8: 50 – 59

Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swason S, Dunlop CLM, Keiles S, Moss RB, Oehlert J, Gardner P, Wassman ER, Kammesheidt A. Diagnostic Testing by CFTR Gene Mutation Analysis in a Large Group of Hispanics. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005; 7(2):289-299

Schuerle T, Aoun E. Genetic Mutations, Polymorphisms and Pancreatitis. *Practical Gastroenterology* 2012; 36:40

Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Gaillard JL, Silly C, Chretiennot C, Lenoir G, Berche P. L'antibiothérapie dans la mucoviscidose. II Stratégie antibiotique. *Arch Pédiatr* 2000; 7: 645- 656

Smith A. Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1997; 16: 91-96

Spinelli E, Seia M, Melotti P, Marchina E, Padoan R. CFTR mutation in a Arab patient: Clinical and functional features of 875+1G A/875+1G A genotype. *Journal of Cystic Fibrosis* 2009; 8: 282-284

Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA et al. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic

Stanke F, Becker T, Kumar V, Hedtfeld S, Becker C, Cuppens H, Tamm S, Yarden J, Laabs U, Siebert B, Fernandez L, Macek MJ, Radojkovic D, Ballmann M, Greipel J, Cassiman JJ, Wienker TF, Tümmler B. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. *J Med Genet* 2011; 48: 24-31

Stephens M, Smith NJ, Donnely P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68:978 -989

Streit C, Burlamaque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene:molecular analysis in patients from south Brazil. *Mol Genet Metab* 2003; 78: 258 – 264

Somogyi L, Martini SP, Venkatesan T, Ulrich II DC. Recurrent Acute Pancreatitis: An Algorithmic Approach to Identification and Elimination of Inciting Factors. *Gastroenterology* 2001;120:708–717

Tiddens HAWM. Detectin Early Lung Damage in Cystic Fibrosis. *Pediatric Pulmonary* 2002; 34: 228-231

Tzetis M, Kaliakatsos M, Fotoulaki M, Papatheodorou A, Doudounakis S, Tsezou A, Makrythanasis P, Kanavakis E, Nousia-Arvanitakis S. Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the the cationic

trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis. *Clin Genet* 2007; 71: 451–457

Uc A. Chronic pancreatitis in children: Current knowledge in diagnosis and treatment. *Journal of Pediatric Sciences* 2011; 3(4): 92 – 98

Vanscoy, LL., et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1036 – 1043

Vera AL, Henriquez- Roldán CF, González FJR, Molina GF. Búsqueda de la mutación delta F508 y análisis de dos polimorfismos de nucleótido único em El gen CFTR, em uma muestra de población general de Valparaíso, Chile. *Ver Med Chile* 2005; 133: 767 775

Wahl, S.M., Swisher,J., McCartney- Francis, N., Chen, W. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 15-24

Walkowiak J, Lisowska A, Blaszczynski M. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:157-160

Wei L, Wankeerberghen A, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, Cuppens H. Suppressive interactions between mutations located in the two nucleotide binding domains of CFTR. *FEBS Letters* 2000; 473: 149-153

Weiss FU, Simon P, Bogdanova N, Mayerle J, Dworniczak B, Horst J, Lerch MM. Complete cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene sequencing in patients with idiopathic chronic pancreatitis and controls. *Gut* 2005; 54:1456–1460

Wendy KN,Tarabain O, Pancreas divisum: a cause of idiopathic acute pancreatitis. *CMAJ* 2009; 180 (9): 949-950.

Whitcomb D. Hereditary and childhood disorders of the pancreas, including cystic fibrosis. In: Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH, eds. *Gastrointestinal and Liver Disease*, 7th edn. Philadelphia: Saunders, 2002; 881–912.

Witt H. Chronic pancreatitis and Cystic Fibrosis. *J Clin Invest.* 2008; 118:839-41.

Zemel E, Kawclak N, Cnaan R. Prospective evaluation of resultant energy expenditure, nutritional status, pulmonary function and genotype in children with cystic fibrosis. *Pediatric Res.* 1996; 40 (4): 578- 586

Zhon J, Sahin- Tóth M. Chymotrypsin C (CTRC) Mutations in Chronic Pancreatitis. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26 (8): 1238- 1246

6 ARTIGOS

ARTIGO I

SCREENING FOR CFTR GENE VARIANTS IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS IN NORTHERN BRAZIL

REVISTA: BioMed Research International

Martins VC*, Santos AKCR**, Moraes MR**, Sperb-Ludwig F***, Schwartz IVD****

*Cystic Fibrosis Care Program, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Brazil

**Department of Medical and Human Genetics, Universidade Federal do Pará, Brazil

***Post-Graduate Program in Medical Sciences: Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

**** Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Aims: To screen for genetic variants associated with cystic fibrosis (CF) in a patient population with substantial ethnic heterogeneity. **Methods:** Genomic DNA was extracted from 125 patients with cystic fibrosis from Northern Brazil. Exons 11, 12, 18, 19, 21, and 22 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene and their exon-intron junctions were sequenced. **Results:** Of the patients analyzed, 10 had both pathogenic variants and 22 had only one variant identified. **Exon 11** accounted for 77.6% of findings, and a high frequency of the non-pathogenic variant p.M470V (76%) was detected in the study population. The p.F508del mutation was found in 21.6% of subjects. The p.G542X mutation was detected in only one **patient** and the non-pathogenic variant c.3469-65C>A was found in two subjects. . We also describe a novel pathogenic mutation (p.T501I). **Conclusion:** The mutation profile observed in CF patients from Northern Brazil seems distinct from that seen in European populations and in Southern Brazil. The present study highlights the importance of genetic analysis to improve understanding of phenotypic expression and possibly standardize the molecular diagnosis of CF. Clarifying the role of the non-pathogenic variant p.M470V may improve our understanding of the pathophysiology of CF and its phenotypic differences, facilitating identification of genetic origins and ancestry in these groups.

Key words: Cystic fibrosis; *CFTR* gene, non-pathogenic variant

Introduction

The presence of pathogenic variants in both alleles of the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene (NM_000492.3) leads to a complex disease known as cystic fibrosis (CF; OMIM #219700), the expression of which is influenced by other genetic and environmental factors. CF is characterized by chronic obstructive pulmonary disease, pancreatic insufficiency, elevated electrolyte levels in sweat, and infertility (Nikolic et al., 2006; Marson et al., 2013). In Caucasian populations, CF affects 1 in 2,000–3,000 neonates, with a mean heterozygosity rate of 1 in 26 individuals. Conversely, CF is very rare in Asian populations (Ni et al., 2012). Furthermore, few cases have been reported in Africans, probably because the phenotype of CF resembles other diseases common in African populations, which contributes to its underdiagnosis (Mutesa et al., 2009).

The *CFTR* gene encodes a protein that acts primarily as a cAMP-activated chloride channel expressed in the apical membrane of ciliated epithelial cells and exocrine gland ducts, including lungs, paranasal sinuses, pancreas, bowel, sweat ducts, biliary tract, and vas deferens (Bronsveld et al., 1999; Schrijver et al., 2005; Ollero et al., 2006; Nikolic et al., 2006). Evidence suggests that when the *CFTR* protein is defective, the physiological function of the epithelial cell surface and submucosal glands is affected (Stanke et al., 2011).

Since the *CFTR* gene was characterized in 1989, it has been associated with several clinical conditions, including congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), chronic pancreatitis, bronchiectasis, and asthma (Cebotaru et al., 2014; Milisevic et al., 2013). Over 1,900 pathogenic alterations of this gene have been described (www.genet.sickkids.on.ca, 2014); however, the functional consequences of most of these variants remain unknown (Lee et al., 2003; Schrijver et al., 2005). The frequency and distribution of these genetic changes varies widely, but the vast majority is limited to a small number of patients (Bodadilla et al., 2002; Schrijver et al., 2005). Among the most common variants, the p.F508del mutation is present in two-thirds (60%) of alleles studied worldwide; in the remaining cases, however, there is a great degree of allelic heterogeneity (Bodadilla et al., 2002; Navarro, et al., 2002; Stanke et al., 2011).

Some pathogenic mutations of the *CFTR* gene, such as p.F508del, p.G542X, and p.N1303K, are associated with severe phenotypes, but many others are associated with monosymptomatic diseases of the lungs, pancreas, and vas deferens (Morrall et al., 1996; Lee et al., 2003; Du et al., 2014). CF is characterized by a high degree of phenotypic variability, and

CFTR mutations may not explain all clinical findings in this condition. Possible influences from the environment and from modifying genes have been invoked to explain this variability (Ollero et al., 2006; Vanscosy et al 2007; Férec et al., 2012).

The clinical manifestations of CF are multisystemic, and vary widely among individuals and even among siblings homozygous for the same pathogenic mutation (Stanke et al., 2011). Notably, the non-pathogenic variant p.M470V appears to have a major influence on disease severity. Presence of the p.E217G or p.Q1352H mutations in *cis* with the p.M470V variant causes a 60–80% reduction in *CFTR*-dependent chloride and HCO₃⁻ transport activities (Lee et al., 2003). Variant p.M470V has been studied in Iranian patients with CBAVD (Radpour et al., 2006; Du et al., 2014) and in patients with idiopathic bronchiectasis (Lee et al., 2003; Milisevic, 2013). Oskooei et al. (2012) suggested that presence of the p.M470V allele and c.IVS8polyT could be useful markers for prenatal diagnosis of CF when there is a family history of the condition.

CF is the most prevalent inherited metabolic disorder detected by neonatal screening, which usually consists of two stages. The first consists of the immunoreactive trypsin (IRT) assay, which, if elevated, is indicative of CF and should prompt further testing. The second consist of identification of the most common mutations, such as p.F508del. However, this IRT/DNA screening model probably has poor sensitivity for detection of CF in the Brazilian population (Bodadilla et al., 2002), which is the result of a series of migrations of peoples from Europe, Asia, and Africa and their miscegenation, both among themselves and with the indigenous Amerindian peoples of the region (Silva et al., 2000; Callegari-Jacques et al., 2011). There is no information in the literature on the clinical and genetic profile of Brazilian patients with CF from the Northern region of the country.

The present study sought to investigate the frequency of pathogenic and non-pathogenic *CFTR* gene variants in a sample of patients with CF from Northern Brazil.

Methods

This is a cross-sectional, outpatient study. A convenience sampling strategy was used. All patients were recruited from the CF clinic of Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), state of Pará, Brazil, and all provided written informed consent for participation. The study was approved by the HUJBB institutional review board and by the Brazilian National Research Ethics Committee (CONEP).

The criteria for inclusion were a clinical diagnosis of CF and laboratory confirmation by two separate sweat tests (chloride concentration >60 mEq/L by the Gibson–Cooke method).

Clinical data were obtained from a retrospective chart review. Peripheral blood samples were collected into EDTA-containing tubes for genomic DNA extraction with the phenol-chloroform technique and quantitation in a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Six fragments of the *CFTR* gene were sequenced, comprising exons 11, 12, 18, 19, 21, and 22 and their respective exon-intron junctions. These regions were chosen as they concentrate large number of genotypic changes described for the *CFTR* gene. Sequence amplification was performed by the polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. PCR products were sequenced in an ABI Prism 3130 automatic genetic analyzer (Life Technologies, Foster City, CA, USA), using the same primers employed in PCR, and the ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Sequences were then analyzed in the ChromasPro V software suite. The pathogenicity of one of the novel variants discovered was analyzed in the SIFT and Polyphen 2 software environments for *in silico* prediction of the functional impact of amino acid substitution.

Results

The sample comprised 125 patients (70 male, 55 female; mean age, 15.4 ± 11.8 years), of whom 12 were siblings, 4 were first cousins, 2 were born to mothers with CF, and 2 were born to a father with CF. Two patients were referred by their maternal aunts, who were being treated for CF, and five patients were born to consanguineous parents. Except for two brothers from the state of Amapá, all other participants were from the state of Pará, Brazil.

Tables 1 and 2 show the frequencies and distribution of the variants found in the sample. Analyses enabled identification of the two pathogenic variants in 10 patients, of one pathogenic variant in 22 patients, and of no known pathogenic variants in 93 patients. Four different pathogenic variants were found in 31 patients (24,8%). The most common alteration was p.F508del, found in 27 patients (21.6%), of whom 10 (8%) were homozygous and 17 (13.6%) were heterozygous. Two patients had the p.G542X mutation (1.6%) and only one had the p.H841A mutation (0.8%).

The non-pathogenic variant p.M470V was found in 95 patients (76%), of whom 46 were homozygous (36.8%) and 49 were heterozygous (39.2%). Table 2 shows the relationship between the presence of p.F508del and the presence of p.M470V. All patients with the

p.508del mutation also carried p.M740V. Phase determination of these mutations was possible in 27 of 37 alleles, Table 2). In 25 of 27 (92.5%), both mutations were in *cis*; in 2 (7.5%), the mutations were in *trans*.

The non-pathogenic variant c.3469-65C>A (rs213989) was found in 2 patients, whereas c.1584+51_1584_61dup11, located in intron 11 and deemed probably non-pathogenic, was found in one individual. No variants were observed in exons 18, 19, and 21.

A novel variant was identified: c.1502C>T (p.T501I), located in exon 11. The potential pathogenicity of this variant was assessed in the SIFT and PolyPhen-2 software suites, which carry out *in silico* prediction of the functional impact of amino acid substitutions. Both PolyPhen-2 and SIFT v.2.2.2 identified this mutation as harmful, yielding maximum pathogenicity scores in both software programs (1 and 0 respectively).

Table 1 Frequency of *CFTR* gene variants in a sample of 125 patients with cystic fibrosis from Northern Brazil.

	Number of alleles (n=250)	Allele frequency (%)
EXON 11		
p.F508del	37	14.8
c.1502C>T (p.T501I)	1	0.4
p.M470V	141	56.4
p.H841A	1	0.4
INTRON 11		
c.1584+51_1584_61dup11	1	0.4
EXON 12		
p.G542X	2	0.8
EXON 18	0	0
EXON 19	0	0
EXON 21	0	0
EXON 22		
c.3469-65C>A	2	0.8

Table 2. Phase determination of the p.M470V mutation in Northern Brazilian carriers of p.F508del (n=27/125)

p.F508del	p.M470V	Number of individuals (n=17)	%
Homozygous	Homozygous	8	29.63
Heterozygous	Homozygous	7	25.93
Homozygous	Heterozygous	2	7.40

Discussion

Our findings suggest that the mutation profile observed in CF patients from Northern Brazil is distinct from that seen in European populations and in Southern Brazil, a fact that may have major implications for local CF screening and management practices.

The ethnic origins of the Brazilian population are highly heterogeneous, as the result of several migration processes distributed irregularly across the five regions of the country (North, Northeast, Midwest, South, and Southeast). In addition to Portuguese and African populations, approximately 4.5 million immigrants – mostly from Italy, Germany, Spain, and Japan – moved to Brazil (Bernadino et al.; 2000; Raskin, 2003). European immigrants settled largely in the South region, whereas those of African descent constitute a large segment of the population in the Northeast and Southeast. The North region is the largest in the country, encompassing the states of Amazonas, Amapá, Acre, Roraima, Rondônia, Pará, and Tocantins, and has the highest prevalence of indigenous individuals in Brazil.

CFTR gene mutations are distributed homogeneously in most of Europe, with a high prevalence of p.F508del (>90%), except in Southern Europe, where a greater degree of heterogeneity is observed (Nikolic et al., 2006; Ramirez et al., 2006). The incidence of p.F508del in Latin America is highly variable, with reported rates being higher than those found in the present sample (29% in Mexico, Colombia, and Uruguay; 34% in Chile, Venezuela, and Cuba; and approximately 60% in Argentina and Southern Brazil) (Ramirez et al., 2006). Among Arab populations, p.F508del is rare, with frequencies ranging from 18% (in the Maghreb) to 34% (in Lebanon) (Desgeorges et al., 1997). p.F508del has never been described in the Chinese residents of Taiwan population (Ni et al., 2012). The massive heterogeneity of *CFTR* gene mutations, with approximately 1900 mutations described as of 2014

(<http://www.genet.sickkids.on.ca/>, 2014), poses a challenge for screening programs (Cabello et al, 2005).

Access to the diagnosis of CF is often limited in developing countries, as the clinical aspects of this condition resemble those of diseases more prevalent in low-income settings, such as protein-energy malnutrition and chronic infections such as HIV and TB. Furthermore, the necessary diagnostic methods are unavailable in many of these countries (Mutesa et al., 2009). Several mutation panels have been developed with the objective of identifying the main variants present in specific populations of CF patients (Collaco et al., 2008); however, this strategy has failed, probably due to the high degree of variability in the frequency and distribution of these mutations across different population groups. Ciminelli et al. (2007) found European CF patients who are homozygous for p.M470 have a higher risk of carrying a CF causing mutation than VV. Interestingly, they suggest a two-phase screening strategy for CF which would consist in first typing all the individuals or couples for the M/V genotype; the at risk individuals or couples only would then be examined with the CF mutation kit in the second phase.

According to Pompei et al. (2006), in several European populations most variation of *CFTR* is associated with the p.M470 allele, while the p.V470 allele shows an 'extended haplotype homozygosity' (EHH). This finding has been interpreted as an example of recent selection caused by the birth of an advantageous mutation (p.M470V). The p.M470 is probably the ancestral allele, since it is the allele found in all the other species studied so far, and it is almost fixed among Sub-Saharan African populations. However, the p.V470 allele is even more frequent than the p.M470 outside of Africa (Pompei et al., 2006). In our sample, the V allele was only slightly more frequent than the M allele.

The relevance of exon 11 in the genotyping of these patients is worth noting, as the largest number of changes was found in this exon. However, the genotyping strategy employed in the present study proved unsatisfactory, as genotype identification was only possible in a small portion of patients (10%).

In view of the ethnic variability of the study population and the costs of molecular diagnosis, our findings suggest that screening for CF by testing for p.F508del is not an effective strategy in Northern Brazil. Further studies should be conducted for complete genotyping of patients in our sample and to define the mutation panel that provides the best sensitivity and cost-benefit ratio for this population.

Acknowledgements: The authors thank the staff at the UFPA Human Genetics Laboratory for their prompt and responsible handling of all genetic analyses for our investigation, without which this study could not have been conducted.

References:

- Bernadino ALF, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CEA, Nakaie CMA, Gomes CET, et al. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals novel mutations. 2000; 4(1):69-74
- Ciminelli, BM., Bonizzato, A., Bombieri, C., Pompei, F., C, Ciccacil, Gabaldo, M., Ciccaci C, Begnini A, Holubova A, Zorzi P, Piskackova T, Maced MJ, Castellani C, Modiano G, Pignatti PF. Highly preferential Association of NonF508del CF mutations with the M470 allele. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2007; 6:15-22.
- Bobadilla JL, Macek MJ, Fine JP, Farrell PM. Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations- Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Human Mutation* 2002; 19: 575-606
- Bronsveld I, Bijman J, Ballmann M, Veeze H, Tümmler. Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1999; 54:278:281
- Cabello GMK,, Cabello, J.S., Camelo, L. et al. Haplotype Distribution of Linkage Disequilibrium Between Four Polymorphic Markers Near the CFTR Locus in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Human Biology* 2005; 77:853-865
- Callegari-Jacques, S. M., Tarazona-Santos, E. M., Gilman, R. H., Herrera, P., Cabrera, L., dos Santos, S. E.B., Morés, L., Hutz, M. H. and Salzano, F. M. Autosomal STRs in native South America—Testing models of association with geography and language. *Am. J. Phys. Anthropol* 2011; 145: 371–381. doi: 10.1002/ajpa.21505
- Cebotaru L, Rapino D, Cebotaru V, Guggino BW. Correcting the Cystic Fibrosis Disease Mutant, A455E CFTR. *PLOS ONE* 2014; 9(1): 1-6
- Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(6) 559-566
- Desgeorges M, Demaille J, Mégarboné A, Carles S, Loiselet J, Guittard C, Claustres M. Cystic fibrosis in Lebanon : distribution of CFTR mutations among Arab communities 1997 ; 100 :279-283
- Du Q, Pan Y, Liu X, Pan B, Wu B. The CFTR M470V, Intron 8 Poly-T, and 8 TG-Repeats Detection in Chinese Males with Congenital Bilateral Absence of the vas deferens. *BioMed Research International* 2014; 2014:1-7
- Férec C, Scotet V, Corvol H. Genetic and modifier genes, atypical and rare forms. *Arch Pediatr* 2012; 19(1): 3-7

- Lee HJ, Choi HJ, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song YS, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12 (18): 2321-2332
- Marson FAL, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interaction of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Med. Genet.* 2013; 14: 60
- Milisevic K, Nikolic A, Rankov AD, Ljubic M, Nestorovic B, Radojkovic D. Analysis of CFTR Gene Variants in idiopathic Bronchiectasis in Serbian Children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2013; 26(2): 93-98
- Morral, N., Dork, T, Llevadot R, Dziadek V, Mercier B, Férec C, Costes B, Girodon E, Zielenki J, Tsui LC, Tümmler B, Estivill X. Haplotype Analysis of 94 Cystic Fibrosis Mutations with Seven Polymorphic CFTR DNA Markers. *Hum. Mutat.* 1996;8:149-159.
- Mutesa L, Azad K, Verhaeghe C, Serges K, Vanbellinghen JF, Ngendahayo L, Rusingiza EK, Mutwa PR, Rulisa S, Koulischer L, Cassiman JJ, Cuppens H, Bours V. Genetic Analysis of Rwandan Patients with Cystic Fibrosis-like Symptoms. *Chest* 2009; 135: 1233-1242
- Ni WH, Jiang L, Fei QJ, Jin JY, Yang X, Huang XF. The CFTR polymorphism poly-T, TG-repeats and M470V in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Asian Journal of Andrology* 2012;14:687:690
- Navarro HM, Kolbach MR, Repetto GL, Guiraldes EC, Harris PD, Foradori AC, Poggi HM, Sánchez ID. Correlation between phenotype and genotype in a group of patients with cystic fibrosis. *Rev Med Chile* 2002; 130: 475- 481.
- Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of Common CFTR Polymorphisms 5T, M470V, and R75Q in Healthy Serbian Population. *Genetika* 2006; 42(7):821- 823
- Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: New answers to old questions. *Proteomics* 2006; 6:4084-4099
- Oskooei KV, Pourbagher R, Larijani B, Niaki HA. IVS8 polyT and M470V polymorphisms in healthy individuals and cystic fibrosis patients in Mazandaran province, Iran. *TUMJ* 2012; 69 (12): 761-767
- Pompei F, Ciminelli BM, Bombieri C, Ciccaccil C, Koudova M., Giorgi1 S, Belpinati A, Cerny Milos, Georges MD, Claustres M, Ferec C, Maced MJ, Modiano G, Pignatti PF. Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations. *Eur J Hum Genet* 2006;14: 85-93.
- Radpour R, Gilani MA, Gourabi H, Dizaj AV, Mollamohamadi S. Molecular analysis of the IVS8-T splice variant 5T and M470V exon 10 missense polymorphism in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Molecular Human Reproduction* 2006: 12(7): 469- 473
- Ramírez AMO, Ramos MD, Jiménez J, Ghio A, Botelli MM, Rezzónico CA, Marqués I, Pereyro S, Casals T, Kremer RD. Mutational spectrum of cystic fibrosis patients from Córdoba province and its zone of influence: implications of molecular diagnosis in Argentina. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 87: 370-375

Raskin S, Pereira L, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Valentim L. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test* 2003; 7:213-8.

Schrijver I, Ramalingam S, Sankaran R, Swason S, Dunlop CLM, Keiles S, Moss RB, Oehlert J, Gardner P, Wassman ER, Kammesheidt A. Diagnostic Testing by CFTR Gene Mutation Analysis in a Large Group of Hispanics. *Journal of Molecular Diagnostics* 2005; 7(2):289-299

Silva JA, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pesa SDJ, Prado VF. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet.* Aug 2000; 67(2): 444–461

Stanke F, Becker T, Kumar V, Hedtfeld S, Becker C, Cuppens H, Tamm S, Yarden J, Laabs U, Siebert B, Fernandez L, Macek M Jr, Radojkovic D, Ballmann M, Greipel J, Cassiman JJ, Wienker TF, Tümmler B. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. *J Med Genet* 2011; 48: 24-31

Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R, Beck S, Hoover-Fong J, Hamosh A, Cutler D, Cutting GR. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 1036-43

www.genet.sickkids.on.ca . Last access: 01 May 2014.

ARTIGO 2

Clinical and epidemiological aspects of patients with cystic fibrosis in the state of Pará, Brazil

REVISTA: Journal of Cystic Fibrosis

Martins VC*, Santos AKCR**, Schwartz IVD***

*Cystic Fibrosis Care Program, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Brazil

**Department of Medical and Human Genetics, Universidade Federal do Pará, Brazil

***Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT

Cystic fibrosis is the most common autosomal recessive exocrinopathy in Caucasian populations, with clinical manifestations including sinusitis, chronic airway infections, pancreatic insufficiency, abnormally elevated electrolyte levels in sweat, and obstructive azoospermia. Diagnosis is based on the presence of two pathogenic mutations in the *CFTR* gene and functional tests that confirm abnormal chloride transport in the affected organs. The objective of this study was to report the clinical profile of 135 patients with cystic fibrosis from the Northern region of Brazil, emphasizing potential ethnic, geographic, socioeconomic, and healthcare-related influences on phenotype expression. **Methods:** This was an observational, outpatient study using a convenience sampling strategy. An epidemiologic questionnaire was completed by means of a chart review and clinical assessment, always conducted by the same investigator. **Results:** Of the subjects included in the sample, 85.2% were brown and 80% had a late diagnosis, despite typical manifestations of the disease. Other characteristics of the sample included low household income, malnutrition, a low frequency of the *p.F508del* mutation (21.4%), and a high frequency of the *p.M470V* polymorphism (76%). **Conclusion:** Knowledge of the clinical variability of patients with cystic fibrosis, taking into account genetic and environmental factors, may facilitate the introduction of therapies and diagnostics better adapted to this population.

Keywords: Cystic fibrosis; typical; atypical

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal monogenic disease in populations of European descent, with an estimated prevalence of 1 in 2000 to 1 in 4000 liveborn neonates, which corresponds to a heterozygosity rate of 1 in 25. CF is an autosomal recessive disorder caused by the presence of pathogenic mutations in the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene, located in chromosome 7. CF affects multiple organs, and the severity of its clinical manifestations is variable (Bergoin et al., 2002; Sheppard et al., 2002; Nolicic et al., 2006; Bombieri et al., 2011; Stanke et al., 2013). The *CFTR* gene encodes a chloride channel. In CF, dysfunction of this channel arrests transepithelial chloride and sodium transport and, consequently, leads to the production of thick, viscous secretions, which obstruct glandular ducts and affect the function of several epithelial-lined organs. This leads to a variety of disease manifestations, which can include airway disease, pancreatic insufficiency, meconium ileus, male infertility, and elevated chloride levels in sweat (Sheppard et al., 1999; Ollero et al., 2006). Over 1600 *CFTR* gene mutations have been described, and evidence has recently arisen of the existence of modulating genes, which may influence disease expression and contribute to the wide phenotypic variability of CF, thus influencing prognosis and long-term survival (Cystic Fibrosis Gene Analysis Consortium; www.genet.sickkids.on.ca/). Approximately half of all patients with CF in the United States are homozygous for p.*F508del*, and another 40% are compound heterozygous for this mutation (Boyle, 2007).

Some manifestations of CF occur early in life, such as chronic airway infection and pancreatic insufficiency, whereas others, such as diabetes, occur later in the natural history of the disease. Although CF is a multisystem disease, the lungs are the most affected organs, both in frequency and in severity (Koch et al., 2002). Pulmonary involvement poses one of the greatest challenges to CF management, and accounts for more than 90% of deaths (Döring et al., 2002; Flume, 2009). The natural history of pulmonary disease in CF consists of early, persistent infections; exaggerated inflammatory response; and structural airway changes (bronchiectasis and progressive airway destruction), leading to respiratory failure (Ollero et al., 2006; Flume et al., 2009). Modifying genes play an important role in phenotypic expression (Castellani et al., 2008; Collaco et al., 2008).

The survival of patients with CF has increased as a consequence of advances in therapy, such as the advent of new drugs; specialized care centers staffed by trained multidisciplinary teams; nutritional support; intensive antibiotic therapy; and neonatal screening (Dalcin et al., 2011; Plant et al., 2013). Major issues that have yet to be addressed include the potential role of socioeconomic conditions and environmental factors in early disease heterogeneity in CF (Grasemann et al., 2013). The present study sought to investigate the clinical profile of CF patients in a population characterized by a high degree of miscegenation (PNAD-IBGE, 2007), with a particular focus on analyzing the diagnostic and clinical context of these patients.

Methods

This was a dynamic cohort study carried out in patients treated at the CF program of Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), Pará, Brazil. In all patients, the diagnosis of CF had been confirmed by two separate sweat tests (chloride concentration ≥ 60 mEq/L by the Gibson–Cooke method after pilocarpine iontophoresis). A convenience sampling strategy was used, with all patients seen at the clinic invited to take part in the study. The study project was approved by the HUJBB Research Ethics Committee. All patients who agreed to take part in the study provided written informed consent.

The variables of interest (clinical and laboratory parameters, pulmonary function tests, and microbiological testing of sputum/swab specimens) were collected at two time points: those concerning diagnosis were collected retrospectively, by means of a chart review (time point 1); those concerning the time of study inclusion (time point 2) were collected prospectively. At time point 2, patients or their legal guardians were asked to complete an epidemiological questionnaire designed to collect data on: place of residence (rural or urban), date of birth, date of diagnosis, self-reported ethnicity, symptoms of pancreatic insufficiency (history of diarrhea, weight loss, failure to thrive, shiny or greasy stools, positive qualitative test for lipids in stool [Sudan test], pancreatic enzyme supplementation), household income, infertility, and gestational history. For patients who died during the study, the last assessment preceding death was taken into account for time point 2 analysis. Information on genotype (*CFTR* gene mutations) was obtained as part of a parallel study and is available elsewhere (Martins VC et al., 2014).

Early diagnosis was defined as a diagnosis of CF confirmed before age 2. Plain chest radiograph findings were assessed by means of the Brasfield scoring system, which scores

radiographic changes on a scale of 0 to 25 (higher scores are better). Clinical disease progression was assessed with the Shwachman–Kulczycki scoring system, which evaluates clinical examination findings, physical activity, nutritional aspects, and chest radiograph changes on a scale of 0 to 100 (higher scores are better).

Descriptive statistics were used for analysis. The chi-square test was used for analysis of results and to test for associations between the variables of interest. Analyses were carried out in the IBM SPSS 20 software environment.

Results

Overall, 152 patients are followed at the HUIBB outpatient CF clinic; however, only 135 agreed to take part in the study. Of these patients, 22 (8.5%) were related and 5 were the children of consanguineous couples. The clinical characteristics of all patients at the time of enrollment are shown in Table 1.

Table 1 – Clinical profile of patients with cystic fibrosis treated at Hospital Universitário João de Barros Barreto, Pará, Brazil.

<i>VARIABLE</i>	<i>PATIENTS</i> (n=135)
Mean ± SD age at enrollment, years	15.44 ± 11.8
Mean ± SD age at diagnosis, years	10.00 ± 9.6
n (%)	
18 years	41(30.4%)
< 18 years	94(69.6%)
Household income, n (%)	
1 × minimum wage	59 (43.9%)
1–3 × minimum wage	50 (37%)
3–10 × minimum wage	20 (14.8%)
> 10 × minimum wage	6 (4.4%)
Sex, n (%)	
Male	76 (56.3%)
Female	59 (43.7%)
Ethnicity, self-reported, n (%)	
Brown (mestizo)	111 (82.2%)
Caucasian	24 (17.8%)
African	0 (0%)

Place of residence, n (%)	
Rural	44 (32.6%)
Urban	91 (67.4%)
Smokers in household, n (%)	
Yes	22 (16.3%)
No	113 (83.7%)
Pancreatic insufficiency, n (%)	
Present	105 (77.8%)
Absent	30 (22.2%)
Malnutrition at diagnosis (percentile), n (%)	44 (32.6%)
Malnutrition after treatment (percentile) , n (%)	30 (22.2%)
Diabetes, n (%)	4 (3.0 %)
Liver disease, n (%)	33 (24.4%)
Form of CF, n (%)	
Typical	107 (79.3%)
Atypical	28 (20.7%)
Sputum/swab culture findings, n (%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 (37.04%)
<i>Burkholderia cepacia</i>	11 (8.15%)
<i>Staphylococcus aureus</i> **	67 (49.63%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5 (3.7%)
Mycobacteria***	4 (2.96%)

* SD = standard deviation

** None methicillin-resistant (MRSA).

*** One patient with an atypical mycobacterium (*Mycobacterium bolletii*) and two patients with *M. tuberculosis* (one multidrug-resistant).

Symptoms were present at diagnosis in 128 patients (94.8%). The predominant symptoms were respiratory (92.6%), followed by diarrhea (31.9%), hypoproteinemia (3%), meconium ileus (2.96%), and diabetes (1.5%). The diagnosis of CF was suggested by family history in 23 patients (17%). Only 9 patients (6.7%) were diagnosed by neonatal screening. Respiratory symptoms were generally associated with the other manifestations mentioned above. Only two patients diagnosed by neonatal screening were symptomatic at diagnosis

(failure to thrive, reflux, and pneumonia); the remaining patients were asymptomatic, but two had siblings with the disease (Table 2).

Regarding nutritional aspects, body weight improved after diagnosis, with an increase in the number of patients between the 25th and 75th percentiles from 65 (48.1%) to 78 (57.8%). Overall, 44 patients (32.6%) were malnourished (body weight <P10) at diagnosis. After treatment, only 30 remained malnourished (22.2%) at the last study assessment, although there was little catch-up growth (Figure 1).

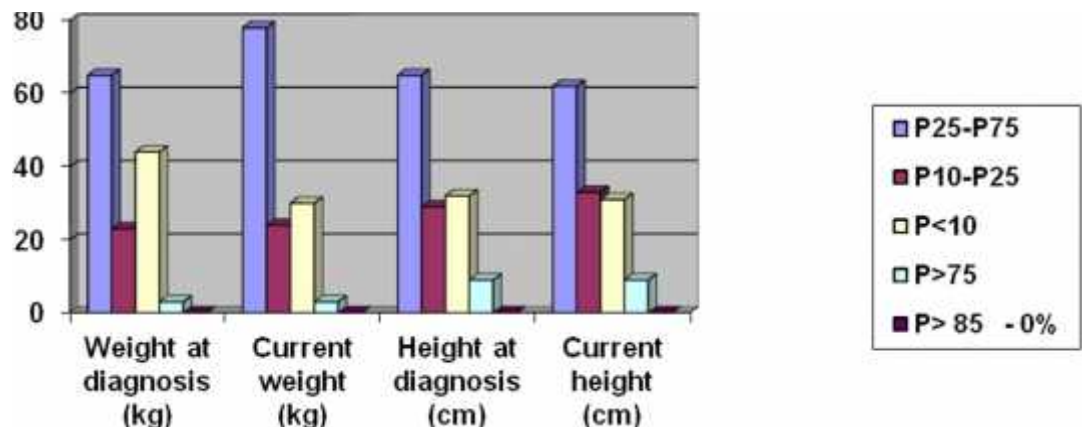


Figure 1. Nutritional aspects of patients with cystic fibrosis, comparing weight and height at the time of diagnosis and at the time of assessment (n=135)

On statistical analysis, progression of FEV1 was found to be uninfluenced by worsening radiographic findings, and to have had no effect on progression of the Shwachman–Kulczycki score between time points 1 and 2 ($p>0.01$, 99%CI). Conversely, *Pseudomonas aeruginosa* infection had a significant influence both on progression of FEV1 and on progression of the Shwachman–Kulczycki score between time points 1 and 2 ($p<0.01$, 99%CI), without, however, any impact on radiographic findings. Inhaled corticosteroid therapy was associated with worse radiographic and clinical scores ($p=0.001$, 99%CI); this may be explained by a greater severity of involvement in these patients, or by the presence of comorbid asthma. Smoking in the household was significantly associated with deterioration of radiographic findings between time points 1 and 2 ($p=0.005$, 99%CI), but had no significant effect on FEV1 in this sample ($p=0.087$, 99%CI). The presence of diabetes was significantly associated with deteriorating FEV1 ($p=0.004$, 99%CI), but no such association with radiographic findings or progression of the Shwachman–Kulczycki score ($p>0.01$, 99%CI). Improvement in body weight and FEV1 was

significantly superior in the presence of early diagnosis ($p=0.001$ and $p=0.002$ respectively, 99%CI) than in patients with a late diagnosis, but early diagnosis was not associated with progression of radiographic findings or clinical score.

Table 2 shows the progression of parameters used to assess clinical status and severity of respiratory involvement.

Table 2. Progression of FEV1, radiographic findings (Brasfield score), and Shwachman – Kulczycki scores, between the time of diagnosis and the time of study interview.

Disease progression	FEV1 * n=85 (%)	Radiographic findings* * n=135 (%)	Shwachman–Kulczycki score n=135 (%)
Unchanged	7 (5.2)	25 (18.5)	73 (54.1)
Improved	39 (28.9)	66 (48.9)	45 (33.3)
Deteriorated	39 (28.9)	44 (32.6)	17 (12.6)

*50 patients under the age of 6 were unable to complete pulmonary function tests.

**Per the Brasfield score, which assesses findings on a scale of 0–25 (higher scores are better).

Discussion

The CF program of HJBB was established in 1998 to meet the diagnosis and management needs of patients who were dying young of chronic pulmonary disease, malnutrition, recurrent diarrhea, and liver disease without an etiologic diagnosis, and who were thus unable to benefit from early treatment of CF. Ever since, a growing number of patients have been diagnosed and followed by a multidisciplinary team, which has provided improvements in clinical progression, reductions in respiratory exacerbations, weight gain, and decreased morbidity. Over the last 10 years, the number of adult patients has grown, and is now largely composed of patients diagnosed in childhood who have survived into adulthood as well as patients diagnosed as adults, but with severe, treatment-refractory respiratory disease.

CF is the most common autosomal recessive genetic disease in Caucasians. Frequent migrations and the consequent miscegenation have allowed the alleles responsible for this disease to spread across various ethnic groups, with diverse and distinct phenotypic

expressions (Ni et al., 2012). If disease variability broadly reflects environmental influences, a renewed focus on these factors – which may include the intensity of healthcare, the treatments provided for different pulmonary infections, socioeconomic factors, and geographic effects on temperature – is required (Knowes et al., 2012). Within this context, we idealized the present study and found that patients with CF from Northern Brazil differ in several aspects from those from Southern Brazil, Northern Europe, and the United States. This is explained by the fact that the population of Pará (the second-largest state of Brazil) was formed by contributions from Portuguese and Japanese immigrants – with relative little influence from Italian, French, and Lebanese immigrants –, a large migration of natives from the neighboring state of Maranhão, and the original indigenous Amerindian inhabitants of the area. This has produced a population that is 73% brown, 23% Caucasian, 3.5% African, and 0.6% Amerindian (PNAD – Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar, IBGE, 2007). According to the Brazilian Cystic Fibrosis Registry, the recorded population of CF patients in the country as of 2011 was 72% Caucasian, 22% mixed-race, and 6% African; this is due to the fact that 75% of patients in the registry were from the South and Southeast regions of the country. These data are consistent with the findings of Alves-Silva et al. (2000), who conducted an ancestry study of the Brazilian population and found that a greater number of Europeans played a formative role in the population of the South region.

The mean age at diagnosis in our sample (10 years) was surprising. Several factors contributed concurrently to delayed diagnosis in our setting, including the generally low income of our population, the precarious state of the public health system, limited access to high-quality healthcare and diagnostic services, the similarity between CF and other, locally endemic diseases (AIDS, tuberculose, protein-energy malnutrition, short stature, and poor dietary habits), and the fact that neonatal screening for CF has yet to be implemented in the Northern Brazilian public health system. Exposure to tobacco smoke in the home – a risk factor for disease exacerbations and deterioration of chronic lung disease – was a daily occurrence in 22 of the patients in our sample.

CF was first described by Andersen in 1938. At the time, it was considered a rare disease that occurred exclusively in children and was manifested chiefly by impaired pancreatic function and by an inevitable lethal outcome. Now, however, CF is recognized as one of the most common causes of morbidity and mortality in childhood (Nolan et al., 1976; Boyle, 2007). With the implementation of new treatment approaches and the advent of care at specialized facilities, the life expectancy of patients with CF has been on the rise, and a growing number of adults with the condition have been observed in several facilities. This is particularly the case at HUIBB, where adults currently account for 30.4% of all CF patients.

CF may present with a broad spectrum of phenotypic expression at diagnosis. This spectrum includes the “typical” form, which is caused by two changes in the *CFTR* gene that produce a generalized exocrinopathy of the respiratory, gastrointestinal, reproductive, and hepatobiliary tracts and abnormal pilocarpine-iontophoresis sweat test, intestinal current measurement (ICM), and nasal potential difference (NPD) results; and “atypical” forms with different clinical presentations, including pancreatic sufficiency, mild bronchitis, nasal polyposis, borderline sweat test results or ICM values indicative of low residual chloride secretion in intestinal tissue. The atypical form of CF tends to be diagnosed late due to its clinical similarity to other isolated disease entities (Bronsveld et al, 1999, De Boeck et al., 2005; Kerem et al., 2005). By this classification, one-fifth of patients in our sample had atypical CF. The literature is controversial in terms of the rates of typical versus atypical forms.

Factors responsible for deterioration of pulmonary function include the secretion of abnormally thick mucus, leading to reduced ciliary transport, bronchial obstruction, and consequent infection and inflammation, which trigger progressive destruction of lung parenchyma and bronchiectasis, perpetuating the infection–inflammation cycle. Endobronchial infection may occur recurrently or chronically, increasing mucus retention and usually causing a marked neutrophilic inflammatory response, which leads to airway obstruction. Early manifestations include chronic, intermittently productive cough and dyspnea. As pulmonary involvement progresses as a result of chronic infection, structural injury occurs despite seemingly normal function (Smith, 1997; Moskowitz et al., 2008). Taking into account the natural history of the disease, we have found that therapy can substantially improve quality of life and delay lethal outcomes, but structural injury and later functional deterioration remain. This is demonstrated by the number of patients with radiographic deterioration (32.6%) and the number of patients with worsening FEV1 (28.9%). The Shwachman–Kulczycki score worsened in only 12.6% of patients; this is explained by the fact that this system takes into account nutritional aspects, physical activity (subjective), clinical examination findings, and chest X-ray findings. Therefore, weight gain and clinical improvement skew Shwachman–Kulczycki scores upward.

The present study showed a reduction in the number of malnourished patients at the time of enrollment as compared with the time of diagnosis, but with no improvement in height percentile over the same period. Reis et al. (2000), in a study conducted in a state capital in Southeast Brazil, found a 45% prevalence of malnutrition at 20-year follow-up, down from 63% on admission. Another study showed that the body mass index (BMI) is not an adequate parameter for assessment of nutritional status in patients with CF, demonstrating the importance of body composition analysis and revealing short stature in the study population.

This study also reported low FEV1 values in malnourished patients, as found in our sample (Chaves et al. 2008).

Several microorganisms are associated with recurring pulmonary infection in CF, but infection followed by colonization with *Pseudomonas aeruginosa* is the cause of rapid pulmonary deterioration in these patients (Döring et al., 2002; Rovedder et al., 2008). In the present study, *S. aureus* (49,63%) was more prevalent than *P. aeruginosa* (37,04%). U.S. data suggest that *P. aeruginosa* is the most common pathogen, with a frequency of up to 80% in adolescents and adults, followed by *S. aureus* (40%) and the *B. cepacia* complex (3.1%) (Mirakhur et al, 2003; Dalcin et al., 2011). The low frequency of *Pseudomonas aeruginosa*-positive cultures in our patients may be explained by: (i) collection error, i.e., contamination of specimens at the time of collection or failure to fast patients before collection; (ii) low frequency of patients with *p.F508del*; and (iii) a constant lack of equipment for specimen collection and culture supplies at the microbiology laboratory of the hospital where the study was carried out. Zar et al. (1995) reported that patients homozygous for the *p.F508del* mutation are at increased risk of *P. aeruginosa* infection, as they have a greater number of asialylated receptors for *P. aeruginosa* pili in the respiratory tract mucosa than do other patients.

The *CFTR* gene was identified as being associated with CF in 1989 (Sheppard et al., 2002; Kelles et al., 2006.). The protein encoded by *CFTR* acts as a cAMP-activated chloride channel, promoting cAMP-regulated fluid and bicarbonate secretion, diluting and alkalinizing the pancreatic juice to prevent obstruction of the smaller pancreatic ducts. (Bombieri et al., 2011)The pancreas is affected in nearly all patients with CF, and 15–20% of neonates with the condition present with obstruction of the distal ileum with thick, viscous meconium (Durie et al., 1998; Conklin et al., 2008, Chauhan et al., 2009); however, this contrasts with the low frequency of meconium ileus found in the present study. The 2011 Brazilian CF Registry reported a 7.8% rate of meconium ileus among 2,182 registered patients.

Most CF patients exhibit intestinal malabsorption, which manifests as recurring abdominal pain, voluminous, greasy bowel movements, and consequent weight loss and malnutrition, despite a voracious appetite. Constipation is common, and 25% of adult patients develop bowel obstruction at some point in time. The liver is substantially involved, with obstruction of intrahepatic ducts, inflammatory reaction, and varying degrees of fibrosis. Approximately 10% of patients develop liver cirrhosis with portal hypertension in the first decade of life (Nydegger et al., 2006; Aoyagi, et al., 2001). A minority of patients with CF (13–15%) express the so-called pancreatic sufficient phenotype (Conklin et al., 2008). In our sample, 77.8% of patients had pancreatic insufficiency and 24.4% had hepatic involvement.

CF-related diabetes (CFRD) is a common and serious complication of CF, and its prevalence increases with age. Less than 5% of children with CF have diabetes mellitus, but this rate increases to 20% in adolescents and 40–50% after the age of 40. The primary defect of CFRD is insulin deficiency caused by destruction of pancreatic beta cells. The reason why not all older patients with CF develop diabetes is unknown, but CFRD is more common among patients with pancreatic insufficiency and those with more severe phenotypes (Navarro et al., 2002, Plant et al., 2013) In our sample, four patients (3%) had diabetes, a rate that differs from that reported in the literature but is consistent with the Brazilian CF Registry.

Most men with CF are infertile due to obstructive azoospermia caused by absence of the vas deferens (Ni et al., 2012; Du et al., 2014). Our findings contrast sharply with this fact, as only 10% of adult males in our sample reported infertility. In female CF patients, cervical mucus exhibits reduced water content, which reduces fertility. Malnutrition in women with CF may also contribute to primary or secondary amenorrhea and anovulatory cycles (Edendorough et al., 2008). However, there were no instances of female sterility in our sample, not even among patients with severe respiratory involvement and malnutrition. Of the 29 women of childbearing age in our sample, 10 (34.5%) had a gestational history, including two who had been pregnant twice. One patient in our sample bore a child with CF.

Conclusion

An improved understanding of the pathophysiology of CF and advances in its management by multidisciplinary teams at specialized centers has led to better clinical outcomes and improved life expectancy in patients with this condition. The natural course of the disease can often be slowed, although progression cannot be prevented. Diagnosis and treatment of CF are usually only established when patients are symptomatic, which delays interventions that could prevent deterioration. Neonatal screening can identify patients with CF before the disease becomes manifest, creating possibilities for early intervention with a view to modification of prognosis and quality of life.

References

- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pesa SDJ, Prado VF. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am J Hum Genet.* Aug 2000; 67(2): 444–461
- Aoyagi H, Okada T, Hasatani T, Mibayashi H, Hayashi et AL. Impact of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutation on the Occurrence of Chronic Pancreatitis in Japanese Patients. *The Journal of International Medical Research* 2001; 37: 378 – 384)
- Bergoin C, Gosset P. Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis* 2002; 1:110-115
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Girodon E, Sermetg I et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders *Journal of Cystic Fibrosis* 2011; 10: 86–102.
- Boyle MP. Strategies for Identifying Modifier Genes in Cystic Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 52 – 57
- Brazilian Cystic Fibrosis Patient Registry 2011; Annual Report
- Bronsveld I, Bijman J, Ballmann M, Veeze H, Tümmler. Clinical presentation of exclusive cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1999; 54:278:281
- Castellani C, Cuppens H, Macek MJ, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael MB, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrel P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwartz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis analysis in clinical practice. *J Cyst Fibrosis* 2008; 7(3): 179-196.
- Chauhan S, Forsmark CE. Diseases of the Pancreas. *ACP Medicine.* 2009: 11-22
- Chaves CRMM, Britto JAA, Oliveira CQ., Gomes MM, Cunha ALP. Association between nutritional status measurements and pulmonary function in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2009; 35 (5): 409-414
- Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(6) 559-566
- Conklin L, Zeitlin PL, Cuffari C. Cystic fibrosis presenting as recurrent pancreatitis in a young child with a normal sweat test and pancreas divisum: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2008, 2: 176
- Cystic Fibrosis Gene Analysis Consortium; www.genet.sickkids.on.ca/
- Dalcin PTR, Ziegler B, Viana VP, Agostini GL, Pinhatti MM, Belloli LFS, Dal'Maso VB. Cystic Fibrosis: Ten-Year Analysis of a Cohort of Adult Program. *Rev HCPA* 2011; 31(2):151- 159

- De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E. Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. *Pediatrics* 2005; 115: 463–469.
- Döring G, Conway SP, Heijerman HGM. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European Consensus. *The European Respiratory Journal* 2002;16: 751-767
- Du Q, Pan Y, Liu X, Pan B, Wu B. The CFTR M470V, Intron 8 Poly-T, and 8 TG-Repeats Detection in Chinese Males with Congenital Bilateral Absence of the vas deferens. *BioMed Research International* 2014; 2014:1-7
- Durie, PR; Forstner GG. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society of Medicine Supplement* 1989; 16 (82):2-9
- Edendorough FP, Borgo G, Knoop C, Lamefors L, Mackenzie WE, Madge S et al. Guidelines for the management of pregnancy in woman with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2008; 7: S2–S32
- Flume PA. Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis. *Respiratory Care* 2009; 54(5): 618
- Grasemann H, Ratjen F. Early lung disease in cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2013; 1:148:157
- Kelles SMS, Kammesheidt A. Identification of CFTR, PRSS1 and AAt mutations in 381 patients with pancreatic. *Pancreas*. 2006;33:221-7
- Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis* 4 2005: 7 – 26
- Knowles MR, Drumm M. The Influence of Genetics on Cystic Fibrosis Phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2:a009548
- Koch C. Early Infection and Progression of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatric Pulmonology* 2002; 34: 232- 236
- Mirakhor A, Gallagher MJ, Ledson MJ, Hart CA, Walshaw MJ. *J Cyst Fibros*. 2003 Mar;2(1):19-24
- Moskowitz SM, Chmel JF, Sternem DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG, Cutting GR. Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and related disorders. *Genet Mes* 2008; 10(12): 851- 868
- Navarro HM, Kolbach MR, Repetto GL, Guiraldes EC, Harris PD, Foradori AC, Poggi HM, Sánchez ID. Correlation between phenotype and genotype in a group of patients with cystic fibrosis. *Rev. méd. Chile* 2002;130(5) :475-481
- Ni WH, Jiang L, Fei QJ, Jin JY, Yang X, Huang XF. The CFTR polymorphism polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in Chinese males with congenital bilateral absence of the vas deferens
- Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, Tomic B, Ljubic M. Analysis of Common CFTR Polymorphisms 5T, M470V, and R75Q in Healthy Serbian Population. *Russian Journal of Genetics* 2006; 42(7):821- 823

Nolan AJ. Cystic fibrosis in adults: the unsuspect pulmonary diagnosis. *CMA Journal* 1976; 114:142-145

Nydegger A, Couper RT L, Oliver M R . Childhood pancreatitis *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006; 21: 499–509

Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: New answers to old questions. *Proteomics* 2006; 6:4084-4099

Plant BJ, Goss CH, Plant WD, Bell S. Management of comorbidities in older patients with cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 164- 764

PNAD, IBGE2007 <http://pt.wikipedia.org/wiki/>

Reis FC. Clinical and nutritional aspects of a Center Cystic Fibrosis -HCUFMG: 20 years of follow-up *Rev Ass Med Brasil* 2000; 46(4): 325-330

Rovedder PME, Ziegler B, Pasin LR, Pinotti AFF, Barreto SSM, Dalcin PTR. Chronic bacterial infection and echocardiographic parameters indicative of pulmonary hypertension in patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol* 2008; 34(7): 461-467

Sheppard DN,. Welsh MJ. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews* 1999; 1(79): 23-45

Sheppard MN, Nicholson AG The pathology of cystic fibrosis. *Current Diagnostic Pathology* 2002; 8: 50 – 59

Smith A. Pathogenesis of bacterial bronchitis in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16: 91-96

Stanke F, Becker T, Kumar V, Hedtfeld S, Becker C, Cuppens H, Tamm S, Yarden J, Laabs U, Siebert B, Fernandez L, Macek MJ, Radojkovic D, Ballmann M, Greipel J, Cassiman JJ, Wienker TF, Tümmler B. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. *J Med Genet* 2011; 48: 24-31

Zar, H.; Saiman, L; Quitell, L.; Prince, A. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *Journal Pediatric* 1995; 3: 126-230

ARTIGO 3

BIOMODULADORES DA PROTEÍNA CFTR E A MORBIDADE POR DOENÇA RESPIRATÓRIA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA NO ESTADO DO PARÁ

REVISTA: Jornal Brasileiro de Pneumologia

Martins VC*, Santos AKCR **, Moraes MR**, Sperb-Ludwig F***, Schwartz IVD****

*Programa de Assistência a Pacientes com Fibrose Cística do Hospital Universitário João de Barros Barreto – Universidade Federal do Pará – Brasil

**Departamento de Genética Médica e Humana – Universidade Federal do Pará-Brasil

***Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

**** Departamento de Genética - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Serviço de Genética Médica–Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Bras

SHORT REPORT

A Fibrose Cística (FC; OMIM#219700) é a doença autossômica recessiva mais comum entre europeus, afetando 1:2.500 recém-nascidos vivos, com uma frequência de 5% de portadores para alterações no gene Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (*CFTR*; NM_000492.3) cuja principal função é regular o fluxo de eletrólitos de cloro e, secundariamente o fluxo de sódio e água para o espaço extracelular (Rommens et al., 1989; Ciminelli et al., 2007). A disfunção da proteína *CFTR* resulta em um produto de elevada viscosidade secretado pelas glândulas exócrinas que causa a obstrução das vias aéreas e dos ductos pancreáticos (Vera et al., 2005). Secreções anormais nos pulmões contribuem para inflamação e infecção, detectadas cedo no fluido de lavado broncoalveolar dos pacientes fibrocísticos. Isto tende para um ciclo vicioso de infecção e inflamação, levando a dano pulmonar, detectado pelo Rx ou tomografia computadorizada do tórax, assim como alteração da função pulmonar, avaliada pela prova da função pulmonar. O progressivo dano estrutural leva o paciente à morte prematura (Tiddens, 2002; Grasemann et al., 2013).

Centenas de mutações com frequências variáveis em diferentes populações têm sido descritas. O gene *CFTR* foi identificado e clonado em 1989, estando localizado no braço longo do cromossomo 7, em 7q31.2. O gene contém 27 éxons, e tem cerca de 250 kb (Kerem et al., 1989, Bernadino et al., 2000, Cabello et al., 2005, Alibakhshi et al., 2007).

As manifestações clínicas mais importantes da FC estão na superfície da árvore brônquica e trato gastrointestinal, locais onde o gene *CFTR* é expresso nas células epiteliais, o que acarreta na doença respiratória crônica e insuficiência pancreática. Outros achados importantes são a infertilidade masculina e os elevados níveis de cloro no suor (Gimbovskaia et al., 1994; Boyle, 2006; Vanscoy et al., 2007). A FC clássica apresenta doença pulmonar com progressão de inflamação e infecção (usualmente por *Pseudomonas aeruginosa*) e muco viscoso, que progridem para bronquiectasias. Associação entre variações patogênicas específicas no gene *CFTR* e doença pulmonar não estão claras, mas são evidenciadas pela ampla variação nas manifestações pulmonares entre pacientes que são homocigotos para a mutação mais comum p.F508del (Kerem et al., 1990; Gimbovskaia et al., 1994, Claustres et al., 1996, Friedman et al., 1997). Bronquiectasia isolada é referida como uma entidade clínica diferente de FC, embora seja um achado comum na doença, sugerindo que bronquiectasias monossintomáticas possam estar associadas com variações patogênicas do gene *CFTR*

(Milisevic et al., 2013). Estudos de correlação entre o genótipo e o fenótipo de algumas manifestações sugerem uma interação mais complexa, envolvendo outros fatores genéticos e do meio ambiente. Em particular, a gravidade da doença pulmonar, que é a maior causa de morbidade e mortalidade em FC, está pouco relacionada com variações no genótipo de *CFTR*, sendo postulado que a gravidade e progressão da doença pulmonar na FC são moduladas por fatores genéticos secundários chamados de modificadores da FC (Boyle et al., 2006; Ruslan et al., 2008).

A função da proteína CFTR ainda não está completamente esclarecida, mas há consenso que esta proteína direta ou indiretamente module a secreção de cloro da célula epitelial em resposta a estímulo, o que eleva o AMPc intracelular e/ou ativa proteinoquinase A. (Rich et al., 1990, Chu et al., 1991; Navarro et al., 2002; Derichs, 2013) Entre as mais de 1.300 mutações do gene *CFTR*, a mais frequente é a p.F508del que contribui com dois terços de todas as alterações genótípicas de fibrocísticos do mundo. O terço restante inclui todos os demais alelos identificados para o gene (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 2004). Contudo estas mutações variam grandemente em sua frequência e distribuição, sendo que a maioria é rara ou restrita a pequenos grupos ou populações (Araújo et al., 2005; Streit et al., 2003).

O gene *CFTR* tem sido extensivamente caracterizado pela sua variabilidade patológica, porém as complexas correlações genótipo e fenótipo ainda necessitam ser esclarecidas (Pompei et al., 2006; Vanscoy et al., 2007). Fatores tais como efeitos ambientais podem explicar a heterogeneidade fenotípica causada por alterações genótípicas brandas. É de grande importância para compreensão dos fenótipos heterogêneos realizar a caracterização de haplótipos, especialmente para as regiões intragênicas do gene *CFTR*. Diversas interações e efeitos aditivos entre múltiplas variantes sejam elas patogênicas ou não, influenciam na função final do produto gênico (Morral et al., 1996; Lee et al., 2003). Diferentes haplótipos, especialmente com baixo nível de expressão na membrana e redução do transporte de HCO₃⁻, foram associados com doença respiratória ou pancreática (Morral et al., 1993; Tzetis et al., 2007; Mekitarian et al., 2012). Notavelmente, a variante p.M470V afeta a expressão da doença na função de transporte de ânions da proteína CFTR (Lee et al., 2003; Vanscoy et al., 2007). O curso e a gravidade da manifestação pulmonar não estão diretamente relacionados a um genótipo específico do gene *CFTR*, sugerindo que genes modificadores dentro ou fora do locus do gene podem influenciar na gravidade do fenótipo dos fibrocísticos. São diversos os mecanismos que influenciam na modulação do fenótipo por alterar a condução de cloro, regular o splicing e a expressão do gene, podendo também modular a susceptibilidade à infecção e a resposta inflamatória dos pacientes (Acton, et al., 2001, Wahl, et al., 2004; Faria et al., 2007; Collaco, 2008).

A relação genótipo-fenótipo já foi caracterizada para as manifestações pancreáticas, mas para as manifestações pulmonares ainda não foi devidamente esclarecida (Conklin et al., 2008, Cohn et al.2013). Muitas são as questões sobre os genes modificadores e a ação de variantes não patogênicas a serem exploradas, a começar pelo reconhecimento da sua importância e influência no fenótipo respiratório da doença. O presente estudo propõe investigar a significância da distribuição genotípica e haplotípica de variantes no gene *CFTR* e sua relação com as manifestações clínicas respiratórias dos pacientes com FC.

Material e Métodos

O estudo é composto de uma “coorte dinâmica” de 125 pacientes diagnosticados com fibrose cística atendidos no ambulatório de referência para Fibrose Cística, do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) – Universidade Federal do Pará (UFPA).O diagnóstico foi realizado através de duas dosagens de eletrólitos no suor em momentos distintos pelo método Gibson & Cooke (Chernick, 1959) com valores iguais ou superiores a 60mEq/l. A análise genética foi realizada no Laboratório de Genética Médica e Humana- UFPA (LGMH-UFPA). O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) do HUJBB (UFPA). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelo paciente/ou responsável legal durante a entrevista médica. Tais pacientes já foram descritos do ponto de vista genético e clínico em artigos prévios do nosso grupo (artigos 1 e 2 da tese). No presente artigo, são apresentados dados sobre a associação da p.F508del e p.M470V com desfechos pulmonares de significância .

Resultados de exames radiológicos de tórax nas incidências pósterio-anterior e perfil foram obtidos através da análise de prontuários. O Escore de Brasfield (EB), que pontua as alterações radiológicas de 0 a 25, maior índice melhor valor, foi utilizado para avaliar a gravidade do comprometimento pulmonar. A prova funcional respiratória foi obtida pela análise de prontuários para pacientes com idade superior a seis anos aptos a realizarem o exame em dois momentos com intervalo mínimo de seis meses, através do Espirômetro Vitalograph Spirotrac III, seguindo-se as orientações da American Thoracic Society 11 para a aceitação das curvas. Para caracterizar a evolução clínica da doença foi utilizado o Escore de Shwachman-Kulczycki (ES), que avalia a atividade física, o exame físico, a nutrição e o quadro radiológico dos pacientes. Para cada item, a pontuação máxima é de 25 pontos; quanto menor o valor do escore, pior o quadro clínico (Santos et al.,2004).

Análise estatística dos dados:

A análise dos resultados e das associações entre as variáveis de desfechos de gravidade de doença respiratória dos pacientes fibrocísticos foram feitas através do teste do qui-quadrado e OR. Para avaliar o efeito da mutação e o efeito ajustado para as variáveis de confusão, foi usado o modelo estatístico Análise de Regressão Logística Multinomial do programa SPSS versão 20.

Resultados

A média de idade dos 125 pacientes que participaram do estudo foi de $15,4 \pm 11,8$ anos, onde 78,7% apresentaram idade inferior a 18 anos, destes 76 (56,3%) eram do sexo masculino e 59 (43,7%) do sexo feminino, com idade média ao diagnóstico de $10 \pm 9,6$ DP anos, prevalecendo o diagnóstico tardio (> 2 anos de idade) em 80% dos pacientes por queixa de doença respiratória de evolução crônica. Vinte e sete pacientes apresentavam a p.F508del (frequência alélica= 14,8%) e 95 pacientes a p.M470V (frequência alélica= 56,4%).

A mutação p.F508del pareceu estar associada com a gravidade da doença respiratória quando os parâmetros avaliados foram Rx de tórax, saturação de O_2 e a infecção por *P. aeruginosa*, contrastando com os resultados observados para a variante p.M470V, que isoladamente não mostrou associação com piora de nenhum índice estudado; porém quando analisado em conjunto com a mutação p.F508del mostrou uma possível associação com a piora da saturação de O_2 e maior infecção por *P. aeruginosa* (Tabela 1). O estudo não mostrou associação entre a gravidade de evolução radiológica e a piora do valor preditivo do FEV1, porém quando comparado com a forma de apresentação clínica, revelou associação com a evolução para piora entre os pacientes com fenótipo atípico da doença ($p= 0,048$; IC 99%). Foi observada a piora do escore de Brasfield e do FEV1 entre os pacientes que faziam uso da corticoterapia inalatória ($p=0,01$; 99% IC). A progressão para piora da imagem radiológica parece ocorrer mesmo naqueles pacientes que negaram durante a entrevista uma limitação na atividade física ($p=0,02$; IC99%).

Para verificar se outros fatores de risco por exposição estariam modificando o fenótipo atribuído a mutação p.F508del, foi feita a análise de regressão logística multinomial para o ajuste frente às variáveis: fumo, uso de corticóide inalatório, diagnóstico precoce/tardio, peso, fisioterapia respiratória, infecção por *P. aeruginosa* e uso de dornase alfa. A análise de

regressão logística revelou a persistência do efeito da mutação sobre as variáveis acima descritas, demonstrando um forte indício de que ser homocigoto para p.F508del aumenta o risco para deterioração observada nos exames radiológicos em comparação aos heterocigotos e demais variantes do gene *CFTR* estudadas (Tabela 2). Quando os dados dos pacientes heterocigotos para p.F508del foram ajustados para as variáveis: período do diagnóstico (precoce/tardio), microbiologia de secreção de vias respiratórias e fisioterapia, observaram-se a perda do efeito sobre a piora na evolução radiológica e quando ajustados para as variáveis: fumo, corticóide inalatório e peso, os efeitos pareceram minimizados (Tabela 2).

Tabela 1. Associação da mutação p.F508del e da variante não patogênica p.M470V com o fenótipo respiratório (n=125 pacientes)

Variáveis	p.F508del (n=27) p (99% IC)	p.M470V (n=95) p (99% IC)	p.F508del / p.M470V (n=27) p (99% IC)
Rx de tórax *	0,001 (0,00 – 0,002)	0,095 (0,088 – 0,103)	0,085(0,078 –0,092)
ES	0,301 (0,289 – 0,312)	0,618 (0,605 – 0,630)	0,707(0,697 –0,719)
SAT O2	0,009 (0,007 – 0,012)	0,109 (0,101 – 0,117)	0,034 (0,029- 0,039)
VEF1	0,322 (0,310 – 0,334)	0,232 (0,221 – 0,243)	0,087 (0,080 – 0,094)
<i>P.aeruginosa</i>	0,001 (0,00 – 0,002)	0,291 (0,279 -0,303)	0,001(0,000 –0,001)
<i>S.aureus</i>	0,470 (0,458 – 0,483)	0,140 (0,130 – 0,149)	0,490(0,477 –0,503)

Tabela 2. Modelos ajustados para a mutação p.F508del e as diferentes categorias de exposição que podem contribuir na evolução para piora no resultado dos exames radiológicos em 125 pacientes com FC do norte do Brasil

		Mutação p.F508del (n=27)	
		Homozigotos (n =10)	Heterozigotos (n=17)
Valor Bruto RR (IC 95%)	Melhorou	1,11 (0,11 – 11,31)	2,22 (0,25 – 19,63)
	Piorou	10,40 (1,25 – 86,41)	2,40 (0,23 – 24,87)
Modelo 1 AjustadoRR (IC95%)	Melhorou	1,05 (0,10 – 10,72)	1,93 (0,22 – 17,27)
	Piorou	10,26 (1,23 – 85,40)	2,31 (0,22 – 24,47)
Modelo 2 AjustadoRR (IC 95%)	Melhorou	1,51 (0,14 –16,13)	2,01 (0,22 – 18,26)
	Piorou	9,74 (1,15 – 82,34)	2,46 (0,24 – 25,69)
Modelo 3 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	1,00 (0,10 – 10,35)	1,26 (0,12 – 13,12)
	Piorou	9,85 (1,18 – 83,32)	1,74 (0,14 – 21,75)
Modelo 4 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	1,16 (0,12 – 11,90)	1,95 (0,22 – 17,60)
	Piorou	1,95 (0,22 – 17,60)	2,12 (0,20– 22,44)
Modelo 5 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	1,14 (0,11 - 11,62)	2,30 (0,25 – 20,70)
	Piorou	10,82 (1,29- 90,67)	2,62 (0,25 – 28,01)
Modelo 6 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	0,95 (0,91 – 9,82)	1,80 (0,17 – 17,18)
	Piorou	9,32 (1,10–78,86)	1,38 (0,12 – 16,37)
Modelo 7 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	0,96 (0,91 –10, 13)	0,81 (0,19 – 17,38)
	Piorou	8,81 (1,00 – 77,13)	1,84 (0,16 - 21,09)
Modelo 8 Ajustado RR (IC 95%)	Melhorou	0,85 (0,81 – 8,98)	2,38 (0,27- 21,42)
	Piorou	2,38 (0,27 – 21,42)	2,59 (0,25- 27,41)

Modelo 1: ajustado para fumo. Modelo 2: ajustado para uso de corticóide inalatório. Modelo 3: ajustado para diagnóstico precoce/tardio. Modelo 4: ajustado para o sexo. Modelo 5: ajustado para o peso. Modelo 6: ajustado para infecção por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Modelo 7: ajustado para fisioterapia respiratória. Modelo 8: ajustado para dornase alfa.

Discussão

Desde a descoberta do gene *CFTR* mais de 1900 variantes patogênicas e 120 variantes não patogênicas já foram identificadas (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). A maioria destas alterações é rara, e a relação com a doença ainda não está completamente elucidada. Contudo, diferentes sintomas são observados em indivíduos fibrocísticos, e alguns deles não apresentam sintomas. A penetrância parcial de variantes patogênicas pode ser explicada pela interferência de variantes não patogênicas, que modificam o efeito funcional em alterações específicas de determinados aminoácidos. Para o locus p.M470V, foi observado que os dois alelos interferem com o processamento e com a atividade do transporte do cloro da proteína CFTR (Wei et al., 2000; Audrezet et al., 2008). Diferentes estudos em populações européias têm sido realizados para definir a ação do haplótipo no qual a variante patogênica mais frequente em *CFTR* ocorre. Em populações com elevada heterogeneidade, a análise de associação entre marcadores polimórficos e determinados locus em *CFTR* pode trazer informações importantes sobre mutações causando doenças e pode indiretamente acompanhar a detecção de portadores para diagnóstico de FC (Cabello et al., 2006).

Loumi et al. (1992) encontraram p.M470V em uma criança com FC com doença grave e associou o evento à presença da variante não patogênica em homozigose neste paciente. Desde então, diversos estudos foram publicados com resultados bastante conflitantes (Stanke et al., 2011). Um aspecto importante da doença pulmonar na FC é a infecção crônica por patógenos, principalmente por *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Burkholderia cepacia*, que levam a inflamação crônica dos tecidos pulmonares e progressiva perda de função pulmonar. Fatores genéticos que influenciam a suscetibilidade à infecção são por esta razão de grande interesse (Ruslan et al., 2008). Observamos a presença de *P. aeruginosa* na análise do escarro/swab de orofaringe em apenas 37,4% dos pacientes, diferindo do estudo realizado na região sul do Brasil, que encontrou a presença deste microorganismo em aproximadamente 50% dos pacientes (Dalcin et al., 2011; Marson et al., 2013). Moss et al. (2002) esclarecem que *P. aeruginosa* é o microorganismo mais prevalente nas vias respiratórias inferiores de pacientes

com FC, presente em 70% dos pacientes com idade superior a 17 anos, onde foi associada a colonização crônica com a necessidade de maior intervenção, e um pior prognóstico.

Drumm, et al., (2005) restringiram a pesquisa genética do locus *CFTR* incluindo apenas pacientes que eram homocigotos para a variante genotípica p.F508del e ainda assim encontraram fenótipos diferentes para doença pulmonar, que variou de mínima a grave. Na análise dos processos infecciosos por *P. aeruginosa* e *S. aureus* o estudo não mostrou associação dos mesmos com a piora no resultado do exame de imagem, sugerindo que a piora nos resultados dos exames radiológicos é inerente à evolução natural da doença, pois a fisioterapia e a dornase alfa também mostraram não modificar a evolução desses parâmetros. Uma diferença na proporção de pacientes com *P. aeruginosa* foi observada entre o grupo de pacientes com grave dano da função pulmonar e aqueles com função pulmonar mais próxima da normal, indicando que variantes genéticas associadas a outros genes podem estar afetando a resposta para a infecção, promovendo bronquiectasias e regulando a imunidade, interferindo na regulação da suscetibilidade para infecção (Wahl, et al., 2004).

O Índice de ES mostrou associação de maior gravidade nos pacientes que foram infectados por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Diversos fatores podem ser associados à melhora neste escore, como as terapias medicamentosas, adesão ao tratamento e terapia para recuperação nutricional. A exposição ao fumo, à microbiologia do escarro e o uso de dornase alfa não mostraram associação com as variantes p.F508del e p.M470V, observando-se a piora do VEF1. Esses dados contrastam com os resultados de Rx de tórax, onde a exposição ao fumo e a presença de p.F508del nos dois alelos mostraram um efeito direto sobre a evolução desfavorável no EB. O uso de corticóide inalatório mostrou associação com a piora do VEF1 e dos resultados do Rx. Isto talvez ocorra devido aos pacientes em uso de corticoterapia inalatória apresentarem um remodelamento brônquico por associação com asma ou mesmo por eles tenderem a apresentar um fenótipo respiratório mais grave. A fisioterapia respiratória não apresentou associação com a melhora do VEF1 ou dos resultados radiológicos, talvez devido à falta de adesão por grande parte dos pacientes que tendem a só utilizá-la durante as exacerbações ou quando apresentam sintomas mais graves de evolução progressiva para falência respiratória. McNamara et al. (2009), observaram em seu estudo sobre adesão ao tratamento por via inalatória que apenas 30% dos pacientes adultos faziam a fisioterapia respiratória diariamente, que apenas 54% dos adultos usavam a dornase alfa regularmente e que 78% das crianças faziam a fisioterapia e o uso de medicamentos inalatórios diariamente. Estes dados foram muito semelhantes aos observados em nosso estudo. Os pacientes com a forma clássica de manifestação da FC apresentaram um maior risco de agravamento da doença respiratória, e isso se deve ao fato destes pacientes geralmente apresentarem um genótipo mais grave com sintomas mais exuberantes desde a primeira infância.

Conclusões

A identificação de genes modificadores e suas interações na FC e em outras doenças está apenas começando. Os resultados deste estudo demonstram que a presença da variante p.M470V isoladamente parece não afetar a evolução para gravidade da doença respiratória, mas confirmam achados anteriores da relevância da mutação p.F508del, tanto nos homocigotos quanto heterocigotos, revelando que a presença de um alelo contendo a variante patogênica sugere maior risco para um prognóstico respiratório desfavorável. As interações entre p.F508del e p.M470V não puderam ser avaliadas devido a frequência desta variante na população estudada ser muito baixa, limitando as análises estatísticas e, portanto, a compreensão de como p.M470V influencia na expressão do fenótipo da FC. Fatores genéticos e ambientais, além das variantes patogênicas para o gene *CFTR*, podem ser modificadores da doença pulmonar na FC.

Referências Bibliográficas

- Acton JD, Wilmot RW (2001) Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes. *Paediatric respiratory reviews* 2: 332-339.
- Alibakhshi R, Kianishirazi R, Cassiman JJ, Zamani M, Cuppens H Analysis of the *CFTR* gene in Iranian cystic fibrosis patients: Identification of eight novel mutations. *J Cyst Fibros* 2007; 388.
- Andrezet MP, Dabricot A, Marechal C, Ferec C. Validation of High-Resolution DNA Melting Analysis for Mutation Scanning of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*) Gene. *Journal of Molecular Diagnostics* 2008; 10(5): 424-434
- Araujo, FG., Novaes, FC. , Santos NPC, Martins, VC. , Souza, SM., Santos, SEB., et al. Prevalence of F508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz. J Med Biolog Res* 2005; 38:11-15.
- Bernadino ALF, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CEA, Nakaie CMA, Gomes CET, et al. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals novel mutations. 2000; 4(1):69-74
- Boyle MP. Strategies for Identifying Modifier Genes in Cystic Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 52 – 57
- Claustres, M., Desgeorges, M., Moine, P., et al. *CFTR* Haplotype Variability for Normal and Mutant Genes in Cystic Fibrosis Families from Southern France. *Hum. Genet.* 1996; 948:336-344

Cabello GMK, Cabello PH, Lopez-Camelo JS, Llerena JC Jr, Fernandes O. Haplotype Distribution of and Linkage Disequilibrium Between Four Polymorphic Markers Near the CFTR Locus in Brazilian Cystic Fibrosis Patients. *Human Biology* 2005; 77:853-65.

Cabello GMK, P.H., Cabello, J.S., Fernandes O. Polymorphic Markers Suggest a Gene Flow of CFTR Gene from Sub-Saharan/Arabian and Mediterranean to Brazilian Population. *Journal of Heredity* 2006; 97(4):313-317

Chu CS, Trapnell BC, Murtagh JJ Jr, Moss J, Dalemans W, Jallart S, et al. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *EMBO J* 1991; 10:1355-63.

Ciminelli, BM., Bonizzato, A., Bombieri, C., Pompei, F., Ciccacil, Gabaldo, M., et al. Highly preferential Association of NonF508del CF mutations with the M470 allele. *Journal of Cystic Fibrosis*; 2007; 6:15-22.

Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation Between Mutations of Mutations of the Cystic Fibrosis Gene and Idiopathic Pancreatitis. *The New England Journal of Medicine* 2013; 339 (10): 653-659

Conklin L, Zeitlin PL, Cuffari C. Cystic fibrosis presenting as recurrent pancreatitis in a young child with a normal sweat test and pancreas divisum: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2008, 2:176

Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(6) 559-566

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. 2004. Cystic Fibrosis Mutation Database. Available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>

Dalcin PTR, Ziegler B, Viana VP, Agostini GL, Pinhatti MM, Belloli LFS, Dal'Maso VB. Cystic Fibrosis: Ten-Year Analysis of a Coort of Adult Program. *Rev HCPA* 2011; 31(2):151-159

Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 2013; 22: (127): 58–65

Drumm, ML., et al. Genetics modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1443-1453.

Friedman KJ, Heim RA, Knowles MR, Silverman LM. Rapid characterization of the variable length polythymidine tract in the cystic fibrosis (CFTR) gene: association to the 5T allele with selected CFTR mutations and its incidence in atypical sinopulmonary disease. *Hum Mutat* 1997; 10: 108-15

Faria EJ (2007) Investigação da associação entre os polimorfismos dos genes: MBL 2, TGF- 1 e CD14 com a gravidade do quadro pulmonar na fibrose cística. Tese de Doutorado (UNICAMP). *Genet Test* 2000; 4:69-74.

Gimbovskaia SD, Kalinin VN, Ivashchenko TE, Baranov VS. Molecular - genetic analysis of certain mutations of the [quot] cystic fibrosis gene [quot] in Moldavia. Characteristics of molecular markers and their linkage with various mutations. *Genetika* 1994;30(12):1616-20.

Grasemann H, Ratjen F. Early lung disease in cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 148- 157

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-80.

Kerem, E., Corey, M., Kerem, B., et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analyses of the most common mutation (Delta F508). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517 – 22.

Lee, H.J., Choi, J.H., Namkung, W., Hanrahan, J., Chang, J., Song, S.Y., Park, S.W., Kim, D.S. et al. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Human Molecular Genetics* 2003; 12: 2321-32

Loumi O, Cuppens H, Benabadji M, Marynen P, Cassiman JJ. An Algerian Child homozygous for the M470V polymorphism and for a deletion of two nucleotides in exon 10 of the CFTR gene, shows severe cystic fibrosis symptoms. *Genet Couns* 1992; 3 (4): 205 – 207

McNamara PS, McComack P, McDonald AJ, Heaf L, Southern KW. Open adherence monitoring using routine data download from an adaptive aerosol delivery nebulizer in children with cystic fibrosis 2009; 8: 258 - 263

Marson FAL, Bertuzzo CS, Secolin R, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Genetic interaction of GSH metabolic pathway genes in cystic fibrosis. *BMC Medical Genetics* 2013; 14 :60

Mekitarian Filho E, Carvalho WB, Silva FD. Acute pancreatitis in pediatrics: a systematic review of the literature. *J Pediatr* 2012;88(2):101-14.

Milisevic K, Nikolic A, Rankov AD, Ljubic M, Nestoravic B, Radojkovic D. Analysis of CFTR Gene Variants in idiopathic Bronchiectasis in Serbian Children. *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 2013; 26(2): 93-98

Morral, N., Dork, Th., et al., Haplotype Analysis of 94 Cystic Fibrosis Mutations with Seven Polymorphic CFTR DNA Markers. *Hum. Mutat.* 1996;8:149-159.

Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, et al. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1015-22.

Moss RB. Long-term Benefits of Inhaled Tobramycin in Adolescent Patients with Cystic Fibrosis. *Chest* 2002; 121: 55 - 63

Navarro HM, Kolbach MR, Repetto GL, Guiraldes EC, Harris PD, Foradori AC, Poggi HM, Sánchez ID. Correlation between phenotype and genotype in a group of patients with cystic fibrosis. *Rev. Méd. Chile* 2002;130 (5) :475-481

Pompei, F., Ciminelli, B.M., Bombieri, C., Ciccacil, C., Koudova, M., Giorgi, S., et al. Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations. *Eur J Hum Genet* 2006 ;14: 85-93.

Rich, D.P., Anderson, M.P, Gregory, R.J., Cheng, S.H, Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klingler, K.W, Smith, A.E , Welsh, M.J. *Nature* 1990; 347: 358-363.

Rommens, J.M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., et al., Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* 1989; 245:1059-1065.

Ruslan,D., Sandford,A., Taylo,C., Huang,B., Frangolias,D., Wnag,Y., Sang,R., Pereira,L., Sun,L., et.al. Comple two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118:1040-49

Santos C.I.S., Ribeiro J.R.,Ribeiro A.F., Hessel G. Análise Crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: Estado de arte. *J Bras Pneumol* 2004; 30(3): 286-298.

Stanke F, Becker T, Kumar V, Hedtfeld S, Becker C, Cuppens H, Tamm S, Yarden J, Laabs U, Siebert B, Fernandez L, Macek MJ, Radojkovic D, Ballmann M, Greipel J, Cassiman JJ, Wienker TF, Tümmler B. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. *J Med Genet* 2011; 48: 24-31

Streit C, Burlamaque-Neto AC, Abreu e Silva F, Giugliani R, Pereira MLS. CFTR gene:molecular analysis in patients from south Brazil. *Mol Genet Metab* 2003; 78 :259-64.

Tiddens HAWM. Detecting Early Strutral Lung Damage in Cysitic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34:228 -231

Tzetis M, Kaliakatsos M, Fotoulaki M, Papatheodorou A, Doudounakis S, Tsezou A, Makrythanasis P, Kanavakis E, Nousia-Arvanitakis S. Contribution of the CFTR gene, the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (SPINK1) and the cationic trypsinogen gene (PRSS1) to the etiology of recurrent pancreatitis. *Clin Genet* 2007; 71: 451–457.

Vanscoy, LL., Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, Algire M, McWilliams R,Bech S, Hoover-Fong J, Cutler AHD, Cutting GR. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1036-1043.

Vera AL, Henriquez- Roldán CF, González FJR, Molina GF. Búsqueda de la mutación delta F508 y análisis de dos polimorfismos de nucleótido único em El gen CFTR, em uma muestra de población general de Valparaíso, Chile. *Ver Med Chile* 2005; 133: 767 775

Wahl, S.M., Swisher,J., McCartney FN., Chen, W. TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 15-24

Wei,L., Vankeerberghen,A., Jaspers,I., Cassiman J.J., Nilius,B. Cuppens,H. Suppressive interactions between mutations located in the two nucleotide binding domains of CFTR 2000; 473: 149-153

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FC é uma doença autossômica recessiva com alta incidência na população caucasiana, contudo parece presente em todos os continentes a despeito da diversidade étnica, expressando-se em fenótipos clínicos variados, às vezes com sinais/sintomas que se assemelham às endemias de muitos países, retardando o diagnóstico e agravando o prognóstico. A doença obstrutiva crônica do trato respiratório, responsável pela elevada mortalidade na FC, parece acompanhar o curso clínico da doença independente da etnia a que o paciente pertence. Esclarecer os fatores que impactam o prognóstico da FC parece um grande desafio.

Vários estudos têm sido propostos e desenvolvidos, para compreender e identificar os fatores que contribuem para tal desfecho. Já foram avaliados aspectos envolvidos na inflamação crônica como genes modificadores do meio ambiente e da imunidade que poderiam alterar a expressão final da doença (como TGF β , TNF α) referidos por Stanke et al. (2011), interferência do GSH descrito por Marson et al. (2013), entre outros. Foram propostos estudos em único Centro, assim como multicêntricos, cada qual respeitando as limitações de seu uso; estudos em irmãos e gêmeos também têm sido realizados. Enfim, as propostas sempre confluem para um mesmo propósito, entender como a doença evolui e minimizar o dano. Diante desta complexa expressão fenotípica alguns autores empenharam-se em compreender a origem das principais mutações. Morral et al. (1996), esclareceram que, desde o mapeamento do gene em 1989 (por Lap-Chee, Tsui e Francis Collins), análises de associação de haplótipos e estudo de marcadores microssatélites têm sido realizadas tanto para buscar a origem e evolução das mutações como para procurar entender a grande variabilidade da expressão fenotípica da doença. Pompei et al. (2006) estudando marcadores genéticos polimórficos, sugeriram a existência de concentração preferencial da variabilidade no haplótipo contendo a variante não-patogênica p.M470 no gene *CFTR*, e que este seria um alelo ancestral. Porém, o real papel deste polimorfismo na expressão ou diagnóstico da doença não foi ainda estabelecido.

Entretanto outros fatores podem somar-se às influências genéticas, na progressão da doença envolvendo os pulmões, entre eles a exposição aos

inalantes tóxicos (exposição á fumaça), desnutrição protéico-calórica, acesso e adesão ao tratamento, e a variabilidade da abordagem terapêutica de cada Centro. Os resultados dos estudos são conflitantes, persistindo um grande interesse em desvendar o que há de obscuro no cenário da morbidade por esta enfermidade.

O presente estudo não foi conclusivo, pois não conseguiu avaliar o efeito isolado do polimorfismo, mas seu efeito aditivo junto á mutação p.F508del foi reconhecido. Contudo, trouxe uma discussão sobre abordagem diagnóstica genética em populações com grande heterogeneidade e propõe um estudo multicêntrico para melhor avaliar o papel do polimorfismo p.M470V na doença respiratória da FC.

8 ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA E MÉDICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Você (ou seu filho) está sendo convidado a participar de uma pesquisa denominada: “BIOMODULADORES DA PROTEÍNA CFTR (*M470V*, *R1162X*, *T854T*) E A MORBIDADE POR DOENÇA RESPIRATÓRIA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA NO ESTADO DO PARÁ” que está sendo desenvolvida em conjunto com a Universidade Federal do Pará (UFPA) (Laboratório de Genética Médica), Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2. Para que você decida participar ou não da pesquisa lhe serão prestadas as seguintes informações:

- O objetivo da pesquisa será investigar as alterações genéticas observadas por meio do sequenciamento direto de oito segmentos do gene da fibrose cística e estabelecer as frequências dos seguintes biomarcadores, *M470V*, *R1162X*, *T854T* e procurar compreender o impacto dos achados com gravidade da doença respiratória nos pacientes com Fibrose Cística do HUJBB.

- Os pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Ida Vanessa Döederlein Schwartz, Médica Geneticista, a Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos, Biomédica e a Profa. Valéria de Carvalho Martins, Médica Pediatra.

- **Os dados serão coletados do seu prontuário, dos exames das práticas rotineiras na assistência aos pacientes fibrocísticos do HUJBB, como exame radiológico e tomográfico, prova de função respiratória e exames laboratoriais de sangue e cultura de escarro. As coletas de sangue poderão apresentar desconforto doloroso pertinente ao procedimento. As amostras de DNA serão extraídas das amostras de sangue coletadas dos casos novos e armazenadas no Banco de DNA no Departamento de Genética Médica da UFPA, para o estudo que poderá esclarecer o perfil genético dos pacientes e**

possíveis implicações nas manifestações clínicas e terapêuticas que poderão beneficiar o tratamento e prognóstico.

3. Você terá acesso aos resultados da análise genética e demais exames com garantia de assistência clínica no HUJBB e aconselhamento genético sem qualquer ônus para você ou sua família.

4. A sua participação no estudo não será obrigatória, caso não concorde, o seu tratamento prosseguirá sem qualquer prejuízo. Não terá qualquer despesa com o estudo, assim como nenhuma forma de remuneração pela sua participação .

5. A pesquisa apresenta como risco a divulgação dos dados dos participantes. No entanto, sua participação será sigilosa, somente os pesquisadores saberão de sua participação, não havendo identificação individual do participante, que será feita através de números. Após 05 anos os dados serão descartados.

Belém, _____ de _____ de _____.

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Assinatura do Paciente e ou Responsáveis

Assinatura do Pesquisador Responsável

Testemunha

Telefones para contato:

Dra. Valéria Martins: (91)8112-0277 e (91)3201-6611 (HUJBB)

Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos: (91)8143-1169

Dra. Ida Vanessa Schwartz: (51) 9901-7418

ANEXO II



DINTER/UFPA/UFRGS

PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES COM FC DO PARÁ

- 1- NÚMERO DE ENTRADA NA PESQUISA: _____
- 2- NÚMERO DE **REGISTRO**: _____
- 3- ENDEREÇO: _____
- 4- TELEFONE DE CONTATO: _____
- 5- **DATA DA ENTRADA NA PESQUISA**: _____
- 6- **DATA DE NASCIMENTO**: _____
- 7- **DATA DO DIAGNÓSTICO**: _____
- 8- **DIAGNÓSTICO POR**: TIR- 1 TESTE DO SUOR- 2 HISTÓRIA FAMILIAR- 3 SINTOMAS - 4
- 9- **SINTOMAS AO DIAGNÓSTICO**: ILEO MECONIAL- 1 DIARRÉIA- 2 HIPOPROTEINEMIA (EDEMA) - 3 SINT. RESPIRATÓRIOS - 4 DIABETES -5 AZOOSPERMIA -6
- 10- **ETNIA**: BRANCO =1 NEGRO=2 MESTIÇO= 3 OUTROS= 4
- 11- **SEXO**: FEMININO =2 MASCULINO=1
- 12- **PESO AO DIAGNÓSTICO**: _____ **PESO (KG) ATUAL**: _____
- 13- **ALTURA AO DIAGNÓSTICO**: _____ **ALTURA ATUAL**: _____
- 14- **ESCOLARIDADE**: NENHUMA=0 FUNDAMENTAL I =1, FUNDAMENTAL II=2, MÉDIO= 3 SUPERIOR= 4
- 15- **ESTADO CIVIL**: CASADA: 1 SOLTEIRA:2 DIVORCIADA:3 NÃO SE APLICA: 4
- 16- **PROCEDÊNCIA**: URBANA= 1 RURAL= 2

- 17- PROFISSÃO: NENHUMA=0 SIM= 1 ----- NÃO SE APLICA =2:
- 18- RENDA FAMILIAR= 1 SALÁRIO MÍNIMO= 1 DE 1 A 3 SALÁRIOS MÍNIMOS= 2 ,
3 SALÁRIOS MÍNIMOS = 3
- 19- TABAGISMO: NÃO = 0 SIM=1
- 20- ATIVIDADE FÍSICA (CANSAÇO AOS ESFORÇOS): NÃO=0 SIM=1 _____
- 21- IDADE DA MENARCA: < 11 ANOS = 1 11 A 15 ANOS = 2 >15 ANOS = 3
NÃO SE APLICA= 4
- 22- GESTAÇÃO: SIM=1 NÃO= 0 NÃO SE APLICA= 2
- 23- COMPLICAÇÕES= NÃO = 0 SIM=1 _____
- 24- USO DE ENZIMAS PANCREÁTICAS = NÃO =0 SIM=1
- 25- DOENÇA RESPIRATÓRIA= NÃO=0 PNEUMONIA DE REPETIÇÃO= 1 SINUSOPATIA=2
ASMA=3 OUTROS=4 _____
- 26- SAT 02=_____
- 27- MICROBIOLOGIA DO TRATO RESPIRATÓRIO= _____
- 28- DOENÇA HEPÁTICA = NÃO=0 SIM =1
- 29- DIABETES= NÃO=0 SIM= 1
- 30- CIRURGIA PRÉVIA= NÃO=0 SIM=1 _____
- 31- FISIOTERAPIA RESPIRATÓRIA= NÃO=0 SIM=1 IRREGULAR= 2
- 32- SUPLEMENTO NUTRICIONAL= NÃO=0 SIM=1
- 33- PULMOZYME= NÃO=0 SIM = 1
- 34- CO INALATÓRIO= NÃO=0 SIM=1
- 35- ESTUDO GENÉTICO= _____
- 36- PFRF= FEV1_____CVF_____ (Tempo1) FEV1_____CVF_____ (Tempo 2)
- 37- RX DE TÓRAX = SCORE 1_____ SCORE 2_____
- 38- IND. DE SCHWARTMAN 1= _____ IND. DE SCHWARTMAN 2= _____
- 39- BENEFICIO INSS= SIM -1 NÃO-2
- OBSERVAÇÃO: _____

PESQUISADORA: VALÉRIA DE CARVALHO MARTINS

ANEXO III



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP/HUJBB/UFPA



Carta nº. 07/2013/CEP/HUJBB

Belém, 27 de agosto de 2013.

Protocolo: 01730312.7.0000.0017

Assunto: Notificação de Relatórios

Prezado pesquisador,

Informamos que o protocolo "BIOMODULADORES DA PROTEÍNA CFTR (M470V, IVS8T5, T854T) E A MORBIDADE POR DOENÇA RESPIRATÓRIA EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA NO ESTADO DO PARÁ", referente ao Protocolo CAAE 01730312.7.0000.0017 foi aprovado neste CEP em junho de 2012, sob coordenação da pesquisadora Valéria de Carvalho Martins.

Encontra-se em dias com os relatórios parciais, sendo um entregue em fevereiro e outro em agosto. Com previsão de encerramento do estudo para dezembro do ano corrente.

Atenciosamente,

João Soares Felício
Secretário do CEP/HUJBB/UFPA

