



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

STÉPHANIE VILLA-NOVA PEREIRA

ASSOCIAÇÃO DA GRAVIDADE CLÍNICA DA FIBROSE CÍSTICA COM
VARIANTES NA FAMÍLIA DE GENES *SLC* (*SLC26A9*, *SLC9A3*, *SLC6A14* e
SLC11A1)

CAMPINAS - SP

2017



STÉPHANIE VILLA-NOVA PEREIRA

ASSOCIAÇÃO DA GRAVIDADE CLÍNICA DA FIBROSE CÍSTICA COM
VARIANTES NA FAMÍLIA DE GENES *SLC* (*SLC26A9*, *SLC9A3*, *SLC6A14* e
SLC11A1)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Genética Médica.

ORIENTADOR (A): Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

CO-ORIENTADOR: Dr. Fernando Augusto de Lima Marson

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA STÉPHANIE VILLA-NOVA PEREIRA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO.

Campinas, 2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414a Pereira, Stéphanie Villa-Nova, 1992-
Associação da gravidade clínica da fibrose cística com variantes na família de genes *SLC* (*SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3*) / Stéphanie Villa-Nova Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Carmen Sílvia Bertuzzo.
Coorientador: Fernando Augusto de Lima Marson.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fibrose cística. 2. Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística. 3. Variação genética. I. Bertuzzo, Carmen Sílvia, 1963-. II. Marson, Fernando Augusto de Lima, 1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Association of clinical severity of cystic fibrosis with variants in the *SLC* gene family (*SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3*)

Palavras-chave em inglês:

Cystic fibrosis
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Genetic variation

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Carmen Sílvia Bertuzzo [Orientador]
Camila Andréa de Oliveira
Társis Antonio Paiva Vieira

Data de defesa: 17-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

STÉPHANIE VILLA-NOVA PEREIRA

ORIENTADOR(A) PROF(A). DR(A). CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

COORIENTADOR(A) PROF(A). DR(A). FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). CARMEN SÍLVIA BERTUZZO**
- 2. PROF(A). DR(A). CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA**
- 3. PROF(A). DR(A). TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 17 de fevereiro de 2017.

Dedico aos que acreditam na Ciência.

*Aos pacientes, seus familiares, amigos
e cuidadores.*

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objecto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda”

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível mediante o incentivo e suporte que recebi, baseados nas relações construídas com pessoas incríveis e inspiradoras, desde os primeiros passos da minha trajetória. Contar com essa rede de apoio é um privilégio e uma grande honra. Diante disso, fica o sentimento de gratidão...

...aos meus orientadores, Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo e Dr. Fernando Augusto de Lima Marson, por me instruírem e proporcionarem, durante o desenvolvimento acadêmico, oportunidades de crescimento pessoal e profissional, sob olhares tão perspicazes e acolhedores;

...à Dra. Luciana Cardoso Bonadia, pela *expertise* e paciência diante de tantas perguntas que surgiram dentro e fora do Laboratório de Biologia Molecular;

...aos membros das bancas examinadoras da qualificação e defesa, pelas questões levantadas e contribuições que enriqueceram esse trabalho;

...aos colegas de laboratório que, generosamente, agregaram saberes e experiência, transformando esses anos de estudo em uma incrível jornada de realização pessoal;

...aos professores e funcionários do Departamento de Genética Médica e do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da FCM/Unicamp, pela oportunidade de aprender e usufruir de suas competências;

...aos meus maiores apoiadores na vida, meus pais, Alba Zeli e Oscar Francisco, pela dedicação, zelo e compreensão que proporcionam tranquilidade emocional para seguir adiante;

...aos meus queridos companheiros William Magalhães, Karina Silveira, Luciana Rezende, Thatiane Kanazawa, Cynthia Silveira e Thiago Peluzzo que dividiram comigo as melhores risadas e também o fardo dos momentos de angústia durante esses anos;

...aos demais familiares e grandes amigos, que não cito para ser breve, mas que auxiliam diariamente na construção dessa história com apoio, parceria e bons momentos;

...à CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Introdução: A fibrose cística (FC) se manifesta com variabilidade clínica e anatomopatológica que dependem de fatores ambientais e genéticos. Os genes que codificam canais iônicos têm sido pouco estudados. **Objetivo:** Associar variantes nos genes da família SLC [rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*)] com 43 marcadores de gravidade da FC. **Métodos:** As variantes foram identificadas por *PCR* em tempo real em 188 pacientes com FC considerando o genótipo do gene *CFTR*. A análise estatística foi realizada por testes paramétricos e não paramétricos, considerando a distribuição dos dados categóricos e numéricos. Além disso, foi avaliada a interação gênica e sua associação com a gravidade clínica pela ferramenta *Multifactor dimensionality reduction*. A correção por múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*. Alpha=0,05. **Resultados:** Dependendo das mutações no gene *CFTR*, encontramos associação de: (i) rs3788766*CC com *Pseudomonas aeruginosa* mucoide (OR= 0,171; IC95%= 0,029 a 0,696), *P. aeruginosa* não mucoide (OR= 0,283; IC95%= 0,094 a 0,853) e *Staphylococcus aureus* (OR= 4,443; IC95%= 1,019 a 40,64), maior FEF_{max} (p= 0,041) e melhor resposta ao broncodilatador para FEF_{50%} (p= 0,033) e VEF₁/CVF (p= 0,044); (ii) rs3788766*CT com início precoce dos sintomas pulmonares (OR= 3,524; IC95%= 1,229 a 10,1) e prevalência de osteoporose (OR= 0,203; IC95%= 0,022 a 0,883); (iii) rs3788766*TT com menor índice de massa corpórea (OR= 4,242; IC95%= 1,505 a 11,95), presença de *P. aeruginosa* mucoide (OR= 3,176; IC95%= 1,29 a 7,819) e *S. aureus* (OR= 0,116; IC95%= 0,004 a 0,881), maior escore de Bhalla (p= 0,047) e menores valores de FEF_{max} (p= 0,028) e FEF_{25%} (p= 0,031); (iv) rs7512462*CC com maiores valores do escore de Shwachman-Kulczycki (p= 0,019), CVF (p= 0,043), VEF₁ (p= 0,047), VEF₁/CVF (p= 0,022), FEF_{50%} (p= 0,038) e FEF_{25-75%} (p= 0,016); (v) rs7512462*CT com menores valores de CVF (p= 0,034), VEF₁ (p= 0,047), VEF₁/CVF (p= 0,022), FEF_{25%} (p= 0,012), FEF_{50%} (p= 0,038), FEF_{75%} (p= 0,008), FEF_{25-75%} (p=0,016) e VRE (p= 0,023); (vi) rs7512462*TT com

melhor resposta ao broncodilatador inalatório para VEF₁ (p= 0,011), FEF_{50%} (p= 0,019), FEF_{75%} (p= 0,036) e FEF_{25-75%} (p= 0,008); (vii) rs17235416*Normal com menor valor de SaO₂ (p= 0,010) e maior prevalência de *S. aureus* (OR= 3,333; IC95%= 1,085 a 10,24); (viii) rs17563161*GG com menor idade para início dos sintomas digestivos (OR= 2,564; IC95%= 1,234-5,33). Finalmente, houve interação positiva das variantes e mutações de *CFTR* com: (i) sexo do paciente (p< 0.001); (ii) presença de insuficiência pancreática (p= 0.006); (iii) *P. aeruginosa* mucoide (p= 0.05). **Conclusão:** Na amostra avaliada, a variabilidade clínica e laboratorial da FC foi associada ao genótipo das variantes rs3788766, rs7512462, rs17235416 e rs17563161. Além disso, observamos interação gênica entre as variantes avaliadas, genótipo de *CFTR* e marcadores clínicos da FC.

Palavras-chave: *CFTR*; fibrose cística; *SLC11A1*; *SLC26A9*; *SLC9A3*; *SLC6A14*; variabilidade

ABSTRACT

Introduction: The cystic fibrosis (CF) manifests with clinical and anatomopathological variability who depending on environmental and genetic factors. Genes that encode ion channels have few published studies. **Objective:** To associate the variants in the genes that encode ion channels [rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*)] with 43 severity markers from CF disease. **Methods:** The genetic variants were identified by real-time PCR in 188 patients with CF considering the *CFTR* mutation. Statistical analysis was performed by parametric and non-parametric tests, considering the distribution of the data in categorical and numerical. Moreover, we evaluated the genetic interaction and its association with clinical severity by the Multifactor dimensionality reduction tool. The correction by multiple tests was performed by the False Rate Discovery test. Alpha= 0.05. **Results:** According on mutations in the *CFTR* gene, we found association of: (i) rs3788766*CC with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* (OR= 0.171; 95%CI= 0.029 to 0.696), non-mucoid *P. aeruginosa* (OR= 0.283; 95%CI= 0.094 to 0.853) and *Staphylococcus aureus* (OR= 4.443; 95%CI= 1.019 to 40.64), higher values for FEF_{max} (p= 0.041) and better bronchodilator response for FEF_{50%} (p= 0.033) and FEV₁/FVC (p= 0.044); (ii) rs3788766*CT with early onset of pulmonary symptoms (OR= 3.524; 95%CI= 1.229 to 10.1) and osteoporosis prevalence (OR= 0.203; 95%CI= 0.022 to 0.883); (iii) rs3788766*TT with lower body mass index (OR= 4.242; 95%CI= 1.505 to 11.95), presence of mucoid *P. aeruginosa* (OR= 3.176; 95%CI= 1.29 to 7.819) and *S. aureus* (OR= 0.116; 95%CI= 0.004 to 0.881), highest values for Bhalla score (p= 0.047) and lower values of FEF_{max} (p= 0.028) and FEF_{25%} (p= 0.031); (iv) rs7512462*CC with highest values for Shwachman-Kulczycki score (p= 0.019), FVC (p= 0.043), FEV₁ (p= 0.047), FEV₁/FVC (p= 0.022), FEF_{50%} (p= 0.038) and FEF_{25-75%} (p= 0.016); (v) rs7512462*CT with lower values of FVC (p= 0.034), FEV₁ (p= 0.047), FEV₁/FVC (p= 0.022), FEF_{25%} (p= 0.012), FEF_{50%} (p= 0.038), FEF_{75%} (p= 0.008),

FEF_{25-75%} (p= 0.016) and ERV (p= 0.023); (vi) rs7512462*TT with better bronchodilator response for FEV₁ (p= 0.011), FEF_{50%} (p= 0.019), FEF_{75%} (p= 0.036) and FEF_{25-75%} (p= 0.008); (vii) rs17235416*Normal with lower values of SaO₂ (p= 0.010) and higher *S. aureus* prevalence (OR= 3.333; 95%CI=1.085 to 10.24); (viii) rs17563161*GG with lower age for digestive symptoms (OR= 2.564; 95%CI= 1.234 to 5.33). Finally, there was a positive interaction of variants and *CFTR* mutations with: (i) patient's gender (p< 0.001); (ii) presence of pancreatic insufficiency (p= 0.006); (iii) mucoid *P. aeruginosa* (p= 0.05). **Conclusion:** In our sample, the clinical and laboratory markers of CF severity were associated with the genotype of rs3788766, rs7512462, rs17235416 and rs17563161 variants. Moreover, we observed gene interaction between the variants evaluated, *CFTR* genotype and clinical markers of CF.

Key words: *CFTR*; cystic fibrosis; *SLC11A1*; *SLC26A9*; *SLC9A3*; *SLC6A14*; variability

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação do gene *CFTR* , RNAm e proteína CFTR na membrana plasmática. Representação das etapas de síntese e transporte da proteína CFTR, atividade na superfície celular e detalhes da estrutura 27
- Figura 2.** Imagem representativa das classes de mutações no gene *CFTR*..... 29
- Figura 3.** Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes e mutações no gene *CFTR* em relação ao sexo dos pacientes..... 59
- Figura 4.** Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e as variantes do estudo e mutações no gene *CFTR* em resposta ao sexo dos pacientes com fibrose cística..... 60
- Figura 5.** Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes do estudo e mutações no gene *CFTR* em relação a presença de insuficiência pancreática nos pacientes 61
- Figura 6.** Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e as variantes do estudo e mutações no gene *CFTR* em resposta a presença de insuficiência pancreática nos pacientes com fibrose cística 62
- Figura 7.** Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes do estudo e mutações no gene *CFTR* em relação a presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide nos pacientes.. 63
- Figura 8.** Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e as variantes do estudo e mutações no gene *CFTR* em resposta a presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide nos pacientes com fibrose cística..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos pacientes para o genótipo do gene <i>CFTR</i> e classes de mutações identificadas	44
Tabela 2. Análise descritiva dos marcadores clínicos e laboratoriais dos pacientes com fibrose cística.	45
Tabela 3. Distribuição de genótipos e alelos das variantes nos genes <i>SLC6A14</i> , <i>SLC26A9</i> , <i>SLC11A1</i> e <i>SLC9A3</i> nos pacientes com fibrose cística.....	46
Tabela 4. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	47
Tabela 5. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com a presença de bactérias isoladas na cultura de escarro dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo....	48
Tabela 6. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com o tempo de início dos sintomas pulmonares dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	48
Tabela 7. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com o agrupamento para a categorização do índice de massa corpórea	49
Tabela 8. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com a presença de comorbidades nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	49

Tabela 9. Associação da variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i> com o escore de Bhalla e marcadores obtidos na prova de função pulmonar nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	50
Tabela 10. Associação da variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i> com a idade dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	51
Tabela 11. Associação da variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i> com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	52
Tabela 12. Associação da variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i> com a presença de <i>Burkholderia cepacia</i> nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	52
Tabela 13. Associação da variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i> com os marcadores obtidos na prova de função pulmonar realizada nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo desconsiderando as mutações no gene <i>CFTR</i>	53
Tabela 14. Associação da variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i> com os marcadores obtidos na prova de função pulmonar nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	54
Tabela 15. Associação da variante rs17235416 no gene <i>SLC11A1</i> com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	55
Tabela 16. Associação da variante rs17235416 no gene <i>SLC11A1</i> com a identificação do <i>Staphylococcus aureus</i> nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.	55

Tabela 17. Associação da variante rs17235416 no gene *SLC11A1* com os valores da saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina (SaO₂) dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo56

Tabela 18. Associação da variante rs17563161 no gene *SLC9A3* com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.56

Tabela 19. Associação da variante rs17563161 no gene *SLC9A3* com o início dos sintomas digestivos dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.....57

Tabela 20. Análise de interação das variantes nos genes *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3*, e mutações no gene *CFTR* com o sexo, insuficiência pancreática e presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide na amostra de pacientes com fibrose cística.58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≠	Diferente
>	Maior
≤	Menor e igual
≥	Maior e igual
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
5'	<i>Untranslated region</i>
ACE	<i>Angiotensin I Converting Enzyme</i>
ADIPOR2	<i>Adiponectin Receptor 2</i>
ADRA2A	<i>Adrenoceptor Alpha 2</i>
ADRB2	<i>Adrenoceptor Beta 2</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
bal. acc.	<i>Balance accuracy</i>
BD	Broncodilatador
cAMP	AMP cíclico
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
Cl ⁻	Íons cloreto
COX-2	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
CV	<i>Cross-validation consistency</i>
CVF	Capacidade vital forçada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
fa	Frequência absoluta
FC	Fibrose Cística
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDR	<i>False Rate Discovery test</i>
Fe(2+)	Ferro
FEF _{25%}	Fluxo expiratório forçado a 25% da CVF
FEF _{25-75%}	Fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF
FEF _{50%}	Fluxo expiratório forçado a 50% da CVF
FEF _{75%}	Fluxo expiratório forçado a 75% da CVF
FEF _{max}	Fluxo expiratório forçado máximo
GSH	<i>Glutathione</i>
GSTM	<i>Glutathione S-Transferase Mu</i>
GSTT1	<i>Glutathione S-Transferase Theta 1</i>
H	Íons hidrogênio
H ₂ O	Água
HC	Hospital de Clínicas
HCO ₃	Bicarbonato
IFRD1	<i>Interferon Related Developmental Regulator 1</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
IM	Íleo meconial
IMC	Índice de massa corporal
IP	Insuficiência pancreática
IRT	Tripsinogênio imunorreativo
kg/m ²	Quilograma por metro ao quadrado
M	Magreza

MA	Magreza acentuada
mcg	Micrograma
MDR	<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>
mEq/L	Miliequivalentes por litro
MI	Mutação identificada no gene <i>CFTR</i> pertencente a Classe I, II e/ou III
Mn(2+)	Manganês
MNI	Mutação não identificada no gene <i>CFTR</i> pertencente a Classe I, II e/ou III
MSD	<i>Membrane-spanning domain</i>
N	Tamanho da amostra
Na+	Íons sódio
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng/μL	Nanogramas por microlitros
OEGE	<i>Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
p^c	p corrigido
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RD	<i>Regulator domain</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
SaO₂	Saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina no sangue
SD	Desvio padrão
SK	Escore de Shwachman-Kulczycki
SLC	<i>Solute carrier Family</i>
SLC11A1	<i>Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter)</i>
<i>Member 1</i>	
SLC26A9	<i>Solute Carrier Family 26, Member 9</i>
SLC6A14	<i>Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14</i>
SLC9A3	<i>Solute Carrier Family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3),</i>
<i>member 3</i>	
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TCF7L2	<i>Transcription Factor 7 Like 2</i>
TNF-alpha	<i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VEF₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF
VRE	Volume de reserva expiratória
WNK	<i>With <u>no</u> <u>K</u> = lysine</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitros
χ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Fibrose cística: história.....	20
1.2. Fibrose cística: doença	21
1.3. Fibrose cística: diagnóstico	24
1.4. Fibrose cística: tratamento.....	25
1.5.1. Classes de mutações no gene <i>CFTR</i>	28
1.6. Genes modificadores	31
1.7. Gene <i>SLC6A14</i>	32
1.7.1 Variante <i>rs3788766</i>	33
1.8. Gene <i>SLC26A9</i>	33
1.8.1 Variante <i>rs7512462</i>	34
1.9. Gene <i>SLC11A1</i>	34
1.9.1 Variante <i>rs17235416</i>	35
1.10. Gene <i>SLC9A3</i>	35
1.10.1 Variante <i>rs17563161</i>	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Geral	36
2.2. Específicos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	37
3.1. Sujeitos	37
3.2. Variáveis clínicas	38
3.3. Genotipagem	39
3.4. Análise estatística	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Caracterização da amostra	42
5. DISCUSSÃO.....	65

5.1. Variante rs3788766 no gene <i>SLC6A14</i>	66
5.2. Variante rs7512462 no gene <i>SLC26A9</i>	68
5.3. Variante rs17235416 no gene <i>SLC11A1</i>	69
5.4. Variante rs17563161 no gene <i>SLC9A3</i>	70
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES.....	83
ANEXO 1	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose cística: história

Remonta-se a história da fibrose cística (FC) às sociedades primitivas do Leste Europeu, quando se relata parteiras que reconheciam o suor anormalmente salgado como sinal de que aquele recém-nascido estaria fadado a morte precoce por congestão crônica das vias respiratórias, bem como, problemas no trato digestório¹.

A FC foi reconhecida na literatura pela primeira vez em 1938, quando foi diferenciada da doença celíaca e foram descritas as alterações gastrointestinais decorrentes da obstrução de ductos glandulares pelo muco. Em 1945, a “FC do pâncreas”² foi alternativamente denominada de mucoviscidose, já que se constatou que o muco espesso decorrente da doença se acumulava em diferentes ductos das glândulas mucosas do corpo e órgãos^{1,3}.

Em 1946, a FC foi descrita como uma doença genética com padrão de herança autossômico recessivo⁴. No final dos anos 40, Paul di Sant’Agnese, curioso pela alta incidência de prostração em crianças após intensa onda de calor em Nova York, apresentou a hipótese da secreção epitelial anormal, que se mantém até hoje^{1,5}.

A elevada concentração de íons cloreto (Cl⁻) no suor possibilitou a padronização do teste de iontoforese por pilocarpina, descrita por Gibson e Cooke, em 1959⁶.

Em 1989, Riordan e colaboradores conseguiram isolar segmentos clonados que continham o gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), o que permitiu a identificação de 27 exons e posterior identificação da proteína em alguns tecidos, principalmente de indivíduos saudáveis e de pacientes com FC e mutações de algumas classes específicas (mutações de menor gravidade)⁷⁻⁹.

1.2. Fibrose cística: doença

A FC (OMIM: #219700) é uma doença monogênica de herança autossômica recessiva frequente na população euro-descendente¹⁰, que apresenta incidência variável dentre diferentes grupos étnicos e, até mesmo, dentro do próprio grupo étnico considerado¹¹.

Para que um indivíduo seja afetado pela doença é necessário que tenha herdado uma mutação no gene *CFTR* de cada um dos genitores. Pessoas com apenas uma cópia da mutação são heterozigotos portadores assintomáticos. Cada vez que há o cruzamento de dois indivíduos heterozigotos portadores, a chance de nascer uma criança com FC é de 25%. A chance de nascer um novo heterozigoto portador é de 50% e de haver uma criança sem nenhuma mutação no gene *CFTR* para a doença é de 25%, totalizando 75% de chance de nascer um indivíduo fenotipicamente normal¹².

De acordo com a *Cystic Fibrosis Foundation* (2016), estima-se que exista, aproximadamente, 70.000 indivíduos com FC no mundo, sendo que mais da metade dessa população é maior de 18 anos¹².

O estudo populacional das mutações no gene *CFTR* se mostra importante ao disponibilizar informações para o aconselhamento genético, bem como, contribuir para o desenvolvimento de novas terapias individualizadas¹³.

No Brasil, devido a heterogeneidade populacional, a incidência da FC é descrita, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, não refletindo a realidade do país.

A FC é decorrente da ausência ou expressão alterada (qualitativa/quantitativa) da proteína CFTR, que em condições normais atua como canal de transporte para Cl⁻. As modificações na expressão da CFTR ocorrem decorrentes das mutações no gene *CFTR*. A FC está associada a obstrução crônica da região luminal e recorrentes quadros inflamatórios, em consequência do excesso de muco espesso e hiperviscoso, oriundo do transporte anormal Cl⁻ no epitélio exócrino dos sistemas e tecidos envolvidos na FC^{14,15}.

A FC afeta a maioria dos órgãos do corpo, ao longo da vida, e com grande sobreposição de características. As manifestações clínicas evoluem, principalmente, com numerosos sintomas respiratórios, gastrointestinais (intestino, fígado e pâncreas), de sistema reprodutor e glândulas sudoríparas^{14,16}.

As manifestações pulmonares são as mais desafiadoras pela variação, evolução e gravidade¹⁷ e também são a principal causa de morbimortalidade pela doença, já que o muco acumulado no pulmão se torna um “excelente meio de cultura” para patógenos como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, fungos e vírus, permitindo a multiplicação destes agentes e consequentes quadros graves e agudos de infecção/colonização¹⁸. Além do quadro clínico de infecção/colonização de repetição, a colonização por patógenos secundários ao acúmulo de secreção favorece a deteriorização dos tecidos por causa da metaplasia do epitélio brônquico e desorganização da estrutura ciliar, como resultado de longos e intensos períodos de resposta inflamatória, com infiltração linfocítica, e incapacidade do paciente em esterilizar o trato respiratório. Sendo assim, é comum um curso clínico em declínio até a falência do órgão, que leva a morte ou a necessidade de transplante pulmonar. Além disso, como o comprometimento do aparelho respiratório é progressivo, as vias aeríferas superiores vão sendo afetadas com o passar do tempo, desencadeando, por exemplo, a polipose nasal - comorbidade frequente em aproximadamente 20% dos pacientes com FC adultos¹⁹.

As complicações gastrointestinais podem se manifestar desde o nascimento, pelo íleo meconial (IM), ou ter início em indivíduos de mais idade, pela síndrome de obstrução intestinal distal e alterações secundárias que incluem desnutrição, anemia, neuropatia e osteoporose por consequência da má absorção de nutrientes e vitaminas lipossolúveis, além do diabetes mellitus, pela destruição das ilhotas de Langerhans. Como o pâncreas é o órgão responsável pela liberação de enzimas digestivas e fluidos alcalinos do processo digestivo, a obstrução de seus ductos pelo muco hiperviscoso leva a destruição da estrutura pancreática, pela retenção e

ativação prematura das enzimas e diminuição dos metabólitos na região duodenal. Como as manifestações digestivas são, em sua maioria, secundárias à insuficiência pancreática (IP), os pacientes que não desenvolvem esse quadro clínico, possuem melhor prognóstico devido, principalmente, ao melhor aspecto nutritivo. Atualmente, o uso de suplementos enzimáticos, associados com o controle de dietas altamente calóricas, é uma medida adotada para melhorar o quadro clínico digestivo¹⁹.

Dentre as outras manifestações clínicas relevantes, ocorre o comprometimento reprodutivo masculino pela impossibilidade dos espermatozóides chegarem na uretra, devido à obstrução de ductos seminíferos²⁰; e nas mulheres ocorre alteração das características bioquímicas do muco cervical e presença de ciclos reprodutivos anormais¹. Curiosamente, a infertilidade masculina tem sido a manifestação clínica inicial que permite o diagnóstico de casos mais leves da FC^{21,22}.

Apesar das glândulas sudoríparas não apresentarem anomalias em pacientes com FC, a proteína CFTR não funcional é responsável pela ausência da reabsorção de Cl^- durante o fluxo pelo ducto glandular, bem como, aumento de sódio (Na^+) decorrente da hiperatividade compensatória da proteína ENaC. Dessa forma o fenômeno do suor salgado dos pacientes com FC, desde o início da vida, e que possibilita o diagnóstico pela dosagem de Cl^- no suor é explicado²³.

A correlação entre o genótipo e fenótipo é muito variável, tendo subgrupos de pacientes com manifestações secundárias e terciárias com início tardio, melhor resposta aos tratamentos que são submetidos e melhor qualidade de vida e/ou expectativa de vida. Em um primeiro momento, os subgrupos são relacionados aos tipos de mutações mais “leves” no gene *CFTR*, que acarretam à proteína alterações com menor comprometimento de sua função. Porém, pacientes com FC e mesmas características genótípicas em relação ao gene *CFTR* podem

apresentar fenótipo variável, denotando relação de interação com ambiente e ação moduladora de outros genes²⁴.

1.3. Fibrose cística: diagnóstico

O diagnóstico da FC antes do início dos sintomas clínicos é de suma importância para minimizar os danos permanentes ao pulmão, visto que possibilita a intervenção precoce pelas medidas terapêuticas²⁵.

A FC foi incluída na fase III da triagem neonatal, popularmente conhecida como teste do pezinho, que foi implementada pelo Sistema Único de Saúde em janeiro de 1992 sob Portaria GM/MS nº22. Em junho de 2001 foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal pelo Ministério da Saúde sob Portaria GM/MS nº822. Os estados que se encontram aptos para realização dos testes da fase III são o Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Segundo dados publicados em 2014, a cobertura nacional de triagem neonatal no Brasil é de 84% para a população total de nascidos vivos²⁶.

O teste do pezinho para a FC baseia-se na dosagem de tripsinogênio imunorreativo (IRT) em amostra de sangue. A concentração de enzimas pancreáticas costuma ser persistentemente elevada na corrente sanguínea de recém-nascidos com FC, por consequência das alterações que ocorrem desde a fase intra-útero no pâncreas. O método utilizado possui elevada sensibilidade, porém baixa especificidade, podendo servir de alerta para falsos resultados até os 30 dias de vida. Se após a segunda dosagem de IRT, os níveis ainda estiverem elevados, indica-se outros testes para diagnóstico, preferencialmente a dosagem de Cl⁻ no suor²⁷.

O IRT é um teste de triagem, e quando positivo, necessita de complementação para o diagnóstico da doença. Logo, o diagnóstico da FC pode ser sugestivo por meio da associação

de uma ou mais manifestações clínicas conhecidas, histórico familiar da doença, podendo ser confirmado ou excluído pelo teste de íons no suor (dois exames com níveis de Cl^- acima de 60 mEq/L - considerado o padrão ouro para o diagnóstico de FC), identificação de mutações no gene *CFTR*, por meio de diferentes técnicas, como o sequenciamento completo do gene *CFTR* ou análise de transcritos primários de RNA²⁸, além de outras técnicas mais laboriosas, como o evaporímetro e a biópsia retal, com análise da expressão da proteína CFTR^{29,30}.

1.4. Fibrose cística: tratamento

O tratamento multidisciplinar com fisioterapia pulmonar para melhor transporte mucociliar, controle de dieta associado a reposição enzimática, antibioticoterapia, administração de mucolíticos e expectorantes, terapia personalizada pelos novos fármacos (potenciadores, corretores e/ou estabilizadores da proteína CFTR) e a possibilidade de transplante pulmonar são medidas terapêuticas decorrentes do conhecimento adquirido pelos estudos moleculares e fisiológicos que vêm sendo realizados para o tratamento dos pacientes com FC e que, juntamente com o diagnóstico clínico, atua positivamente no aumento da qualidade de vida e expectativa de vida dos pacientes com FC³¹⁻³³. Diante da ação positiva no aumento da expectativa de vida e no número de pacientes em tratamento, se faz necessária também atenção psicossocial para o desenvolvimento de habilidades individuais, entre outras ações, que visam a melhora na qualidade de vida.

1.5. Gene *CFTR* e proteína CFTR

O gene *CFTR* está localizado na região 7q3.1, e possui aproximadamente 250 kb de DNA, distribuídos em 27 exons, sendo considerando um gene grande e complexo para ser analisado quanto às suas variações^{15,34}.

Conforme representado na **Figura 1**, o RNAm codificado de 6,5 kb é traduzido em uma glicoproteína de 1480 aminoácidos e estrutura complexa denominada CFTR. A CFTR é arranjada em dois domínios transmembrânicos hidrofóbicos, MSD-1 e MSD-2 (do inglês, *membrane-spanning domain*), cada um com seis subunidades que formam o canal de Cl⁻; dois domínios responsáveis pela energia necessária para atividade do canal pela ligação e hidrólise de ATP, NBD-1 e NBD-2 (do inglês, *nucleotide binding domain*) e um único domínio regulatório RD (do inglês, *regulator domain*). A CFTR consiste em um canal de transporte seletivo de Cl⁻ e com funções modulatórias no organismo, ancorado na membrana apical das células epiteliais das vias aeríferas, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas, intestino e aparelho reprodutor¹⁵.

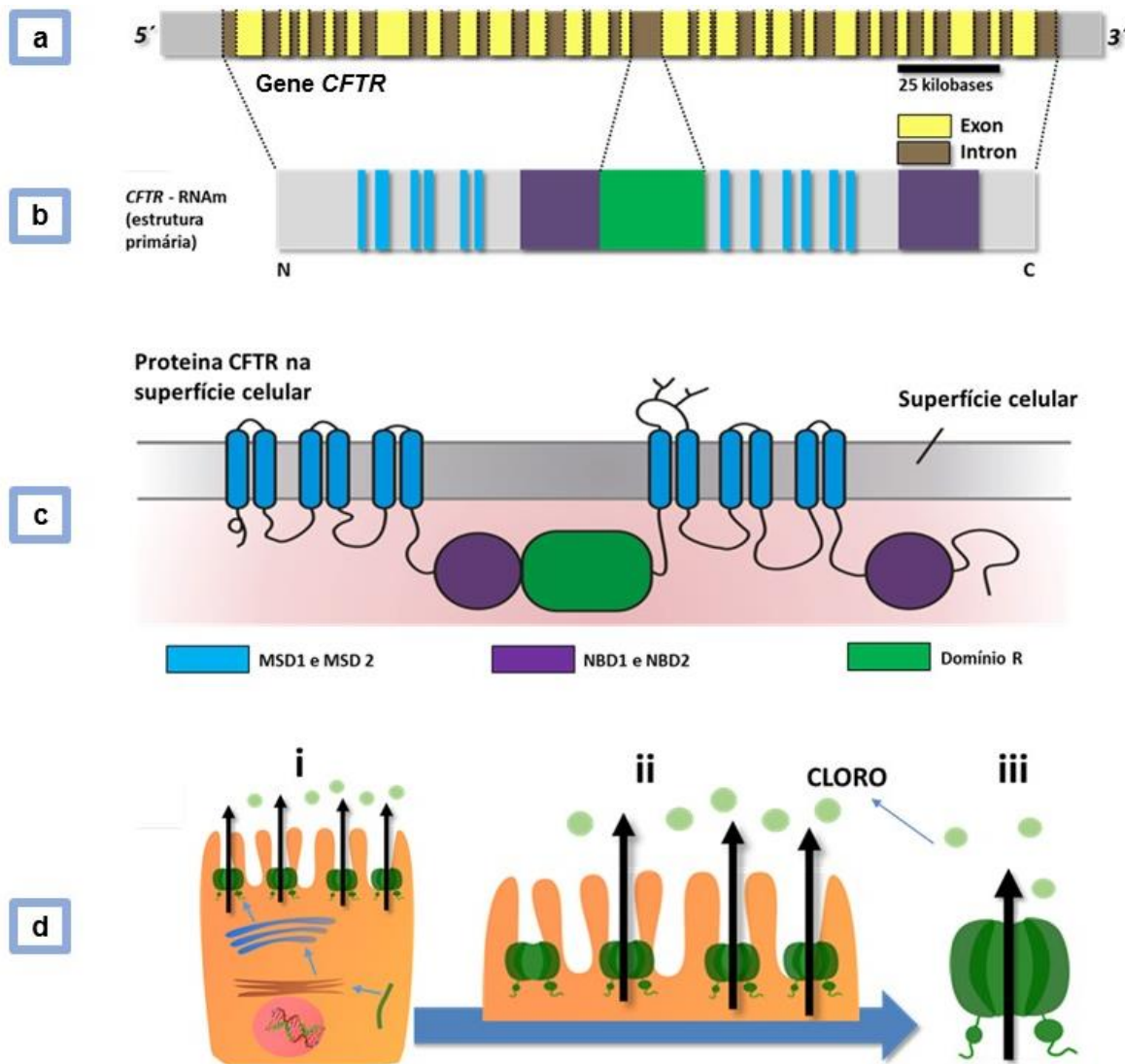


Figura 1: **a.** Representação do gene *CFTR* contendo íntrons e exons; **b.** Esquema do RNAm, antes da maturação da proteína CFTR; **c.** Esquema da proteína CFTR na membrana plasmática com seus diferentes constituintes; **d.** Representação de: (i) etapas de síntese e transporte da proteína CFTR no fluxo da célula para a superfície celular; (ii) atividade na superfície celular como canal de cloreto, e (iii) detalhes da estrutura da proteína CFTR. Adaptado de: Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. *Personalized drug therapy in cystic fibrosis: from fiction to reality*. *Curr Drug Targets*. 2015; 16: 1007-1017.

A regulação da CFTR, a nível funcional é dependente da fosforilação de quinases, e a nível estrutural pela adição de chaperonas moleculares que conferem resistência às proteases. Esse processo ocorre durante a fase de tradução do RNAm pelos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso para, em seguida, a proteína ser transportada para o complexo de Golgi, para a maturação final. Uma vez presente na membrana celular, a CFTR passa por ciclos de

endocitose e reciclagem de volta a membrana. A proteína madura tem meia-vida de 16 horas e é degradada por lisossomos^{35,36}.

Mais de 2000 mutações foram identificadas no gene *CFTR*, a maior parte envolvendo um ou poucos nucleotídeos, sendo variáveis quanto à distribuição ao longo do gene e frequência de acordo com a distribuição geográfica^{37,38}.

Em decorrência de duas mutações no gene *CFTR*, a ausência ou a atividade anormal da proteína CFTR desencadeia um desequilíbrio eletrolítico entre os meios intracelular e extracelular, pela diminuição na excreção do Cl⁻, e consequente, aumento no fluxo do Na⁺ e água, na tentativa de compensação dos meios. Ocorre então a desidratação das mucosas e aumento do muco espesso nos ductos³⁴.

Erros na matriz de leitura que resultam em proteínas truncadas, mutações sem sentido que geram sítio de parada da transcrição prematura, mutações de sentido trocado que codificam aminoácidos diferentes, grandes e pequenas inserções ou deleções de material genético são algumas variações que podem estar ao longo do gene *CFTR*^{39,40}. Dentre essas, a mutação mais frequente é a F508del, também conhecida por Δ F508⁴¹ que é a deleção de três pares de bases (pb) no éxon 10. A ausência da fenilalanina decorrente dessa deleção⁴² é responsável pela deficiência no dobramento da proteína, resultando, posteriormente, na degradação da mesma pelo retículo endoplasmático. A mutação F508del é em homozigose, bem como heterozigose composta, a mutação com maior frequência populacional, independente da faixa etária estudada^{39,43,44}.

1.5.1. Classes de mutações no gene *CFTR*

As mutações no gene *CFTR* são divididas dentre as Classes I (A e B), II, III, IV, V e VI, de acordo com o efeito que exercem na estrutura e função da proteína CFTR madura e sua associação com a gravidade clínica da doença^{15,40,45}, conforme **Figura 2**.

As Classes I, II e III são consideradas as mais graves por englobarem mutações que levam à ausência na produção da proteína CFTR ou produção de proteína não funcional. Já as mutações de Classes IV, V e VI são consideradas menos graves, por estarem relacionadas ao melhor prognóstico, tendo em vista que existe ação funcional, mesmo que baixa, da proteína CFTR^{46,47}.

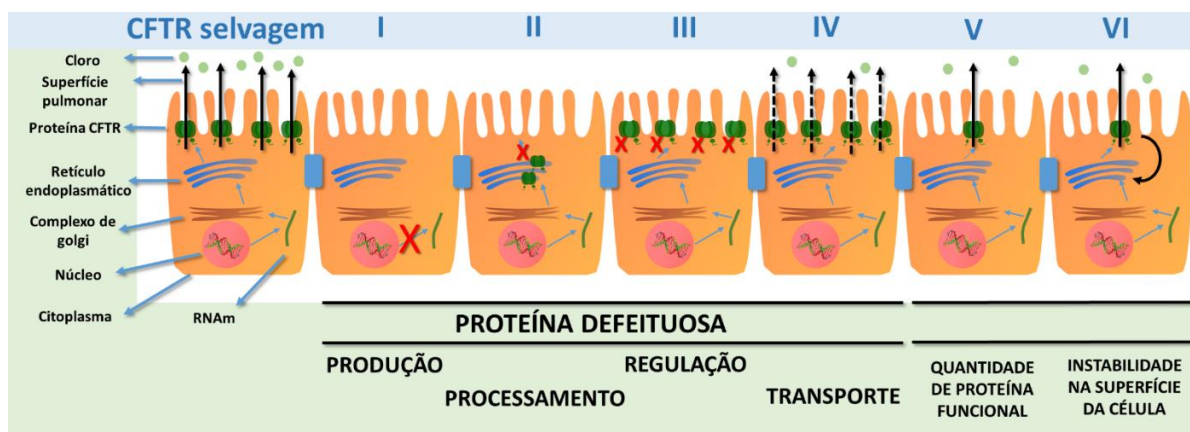


Figura 2: Imagem representativa das Classes de mutações no gene *CFTR*. Primeiro está representado os mecanismos que envolvem a expressão da proteína CFTR desde a transcrição até a ancoragem e função na superfície celular. Em **I** há ausência da transcrição; em **II**, erro de processamento resultante em degradação no retículo endoplasmático; em **III** a regulação da proteína CFTR é defeituosa; **IV** a condução é alterada; **V** possui quantidade reduzida de proteína CFTR na superfície celular e em **VI** há redução na estabilidade da proteína CFTR. Adaptado de: Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. *Personalized drug therapy in cystic fibrosis: from fiction to reality*. *Curr Drug Targets*. 2015; 16: 1007-1017.

Nas mutações de Classe I, a biossíntese da proteína é afetada resultando em ausência da CFTR ativa na membrana apical. Recentemente essa classe foi subdividida em duas: IA para mutações, como por exemplo deleções, de fenótipo grave e sem terapia corretiva personalizada disponível; e IB para mutações do tipo *stop* códon que permitem a correção pela ação de novos fármacos (medicina personalizada)⁴⁸.

A Classe II é a que apresenta maior número de mutações descritas e se caracteriza por ausência da proteína em decorrência de processamento e maturação anormal - ocorre degradação precoce da proteína no retículo endoplasmático rugoso que impede a chegada da

proteína CFTR na membrana, para exercer sua função. A mutação F508del está incluída nessa classe^{44,48}.

A Classe III se relaciona com alterações que atuam no comprometimento da regulação do canal Cl⁻, sendo que o sítio regulador da proteína está acometido. Com isso, a proteína é produzida e alocada na membrana normalmente, porém, o canal não responde ao estímulo do AMP cíclico (cAMP), incapacitando o processo de abertura e consequente função normal da CFTR^{44,48}.

As mutações de Classe IV não afetam a produção e nem localização da proteína CFTR, porém geram menor condução de Cl⁻ e diminuição do tempo de abertura do canal, estando relacionadas à função residual da CFTR (alteração qualitativa da condutividade do poro formado pelos domínios transmembrana da proteína CFTR)^{44,48}.

Nas mutações de Classe V há redução da síntese, resultando em redução da quantidade de proteína apical com estrutura e atividade normal (alteração quantitativa com proteína estruturalmente normal e funcional)^{44,48}.

Por último, a Classe VI tem o processamento da proteína normal, porém com estabilidade reduzida, sendo associada ao *turn over* acelerado e ao processo de envelhecimento do canal de Cl⁻^{44,48}. A Classe VI foi a última a ser identificada, e tem sido descrita a maior prevalência nos pacientes com FC e diagnóstico tardio e doença de menor gravidade.

A classificação das mutações do gene *CFTR* beneficiou o tratamento individualizado para os pacientes de acordo com seu genótipo, tornando-se uma nova possibilidade de sucesso terapêutico⁴⁹.

Apesar das mutações no gene *CFTR* possuírem classificação bem definida entre si, existe variabilidade na expressividade da doença, ou seja, pacientes que apresentam mutações conhecidas e pertencentes à mesma classe podem apresentar fenótipos diferentes, bem como, pacientes que apresentam o mesmo fenótipo, podem apresentar genótipos distintos. Essa

variabilidade sugere uma possível influência pleitrópica de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais na evolução da doença^{14,31,32,50}.

1.6. Genes modificadores

Mesmo com ação que pode passar despercebida em indivíduos saudáveis, torna-se cada vez mais claro que os genes possuem complexa interação e conseqüente influência entre si, desempenhando papel significativamente modulador de gravidade, expressividade e penetrância sob a heterogeneidade fenotípica das desordens mendelianas⁵⁰.

Apesar da dificuldade encontrada em avaliar o efeito relativo que a influência desses genes possui em decorrência de um *pool* de informações que podem estar mascarando sua ação, sua identificação tem grande impacto por possibilitar melhor compreensão da contribuição genética no entendimento da doença e sua variabilidade clínica, das vias de resposta ou tratamento da doença, bem como, por possibilitar novas terapias por meio da medicina personalizada, além de poderem ser marcadores de evolução clínica, após certificada sua associação com a gravidade⁵¹.

Polimorfismos, que, por definição, são variações genéticas com frequência superior a 1% na população, podem ser considerados moduladores de gravidade, principalmente, mas não exclusivamente, da doença pulmonar e/ou presença de microrganismos patogênicos e/ou comorbidades relacionadas à FC⁵². Nesse espectro de alterações, múltiplos genes têm sido descritos com relação a gravidade da FC em nosso grupo de pesquisa, sendo os genes *ACE*, *ADRB2*, *GSTM*, *GSTT1*, *TCF7L2*, *GSH*, *IFRD1*, *COX-2*, *ADRA2A*, *ADIPOR2*, *TNF-alpha* e *IL8*⁵³⁻⁶⁴, alguns exemplos.

Diante da heterogeneidade alélica encontrada no Brasil e a conseqüente dificuldade em conhecer um grupo de mutações comum à nossa população, a continuidade na busca de genes moduladores se faz necessária para, em breve, termos um padrão genético conhecido que possa

auxiliar no tratamento individualizado e conseqüente melhora de qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, alguns genes da família de transportadores de soluto (*SLC*), canais relacionados ao transporte de membrana plasmática, e recentemente, associados com a gravidade da FC em estudos realizados em outros países, foram selecionados para serem avaliados.

1.7. Gene *SLC6A14* [*Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14*]

O gene *SLC6A14* possui 14 exons, aproximadamente 29 kb, localiza-se na região Xq23⁵⁴ e possui 350 variantes relatadas na literatura⁶⁵.

O gene é codificador de uma proteína transportadora dependente de Na⁺ e Cl⁻ com seletividade para aminoácidos como neurotransmissores neutros e catiônicos, além de beta-alanina, que atua por meio de despolarização da membrana, segundo hipóteses anteriormente descritas⁶⁶.

Foi detectada expressão da proteína *SLC6A14*, principalmente, no pulmão, pulmão fetal e glândulas salivares. Além destes, outros tecidos como glândulas mamárias, cólon, útero, próstata, testículos, glândula pituitária, estômago e hipófise apresentam expressão em menor grau⁶⁶.

Curiosamente, apesar do RNAm ser o mesmo, foi observado diferença de massa molecular dentre as proteínas *SLC6A14* originadas em tecidos distintos, o que aponta para possíveis ações pós-traducionais, como glicosilação ou *splicing* alternativo⁶⁷.

A proteína *SLC6A14* possui 12 domínios transmembranares, sendo que os dez primeiros, compõe a região transportadora e os outros dois estão envolvidos na dimerização para o controle da atividade proteica. Sugere-se que exista sítios de ligação para Cl⁻ nas proximidades dos sítios de ligação de Na⁺ para balancear o controle osmótico. Após a ligação

do substrato, a barreira é fechada englobando o mesmo, até que a proteína mude sua conformação para liberá-lo no citosol⁶⁷⁻⁶⁹.

Existe pouca informação sobre a regulação dos domínios da SLC6A14, porém, relata-se aumento da sua expressão na presença da proteína quinase C, sinalizadora de respostas imunes e crescimento celular, sugerindo capacidade de regulação adaptável. Foi descrito, ainda, aumento de sua expressão em pacientes com alterações na homeostase, bem como, em desordens metabólicas decorrentes do aumento no transporte de precursores⁷⁰.

1.7.1 Variante rs3788766

O *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs3788766 está posicionado no sítio de ligação do fator de transcrição⁷¹ e, apesar de haver pouca informação sobre sua ação, em decorrência da interação descrita entre CFTR e SLC6A9 na membrana apical, sugere-se que essa variante possa ser responsável por alterações que interfiram na nutrição epitelial, regulação de fluidos e controle de infecções. A variante rs3788766 foi descrita como fator de risco para IM, e sugestivamente, associada com idade da primeira infecção por *P. aeruginosa*⁷².

1.8. Gene *SLC26A9* (*Solute Carrier Family 26, Member 9*)

As isoformas do gene *SLC26A* são bem conservadas entre as espécies⁷³, sendo detectadas em todos os epitélios com expressão do gene *CFTR*, incluindo grandes quantidades no pulmão, e em menor quantidade, no pâncreas e próstata, com funções fisiológicas de transporte específicas para cada um dos órgãos. Na superfície gástrica, é sugerido que module a secreção de substância para a proteção do epitélio contra lesões pelo ácido gástrico^{74,75}.

O gene *SLC26A9*, que possui, até então, 1007 variantes descritas⁶⁵ foi mapeado, por análise genômica, na região 1q32.1. Possui aproximadamente 25 kb e 21 exons. Como produto final, codifica um canal iônico de 791 aminoácidos regulado por quinases WNK (*with no K* =

lysine)⁷⁵. As quinases regulam o transporte, preferencialmente de Cl⁻ e do bicabornato (HCO₃). A interação desta proteína com a CFTR foi descrita como uma possibilidade de balanço da função de transporte de Cl⁻ e Na⁺, em tecidos que expressam as duas proteínas, como nos epitélios bronquiolar e alveolar, estômago e intestino delgado. A SLC26A9 pode funcionar como via alternativa para o transporte de íons, possibilitando melhora do fenótipo da FC^{76,77}.

1.8.1 Variante rs7512462

O SNP rs7512462 foi descrito como atuante na diabetes melittus e IP na FC por influenciar no transporte de íons decorrente da destruição do epitélio exócrino do pâncreas⁷⁸, e como marcador de risco para o IM⁷².

1.9. Gene *SLC11A1* [*Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1*]

O gene *SLC11A1* está localizado na região 2q35, e possui 15 éxons, e função de codificador de transportador bivalente de metal ferro Fe(2⁺) e manganês Mn(2⁺), estando envolvido no metabolismo do ferro e resistência natural às infecções de certos patógenos intracelulares. O transporte de membrana envolve o sequestro de co-fatores como Fe(2⁺) e Mn(2⁺) específico para proteção dos macrófagos contra suas próprias espécies reativas e ao agente patogênico “negando” cátions para síntese de suas enzimas infecciosas. Com o aumento da expressão de citocinas, moléculas pró-inflamatórias e óxido nítrico, tem ação pleitrópica em atividades exercidas pelos macrófagos, participando na modulação da resposta imuno adaptativa do organismo^{79,80}.

Até o momento, existem 827⁶⁵ variantes descritas na literatura para o gene *SLC11A1*, dentre essas, algumas foram associadas com a susceptibilidade a doenças infecciosas e doenças inflamatórias, tais como, tuberculose, artrite reumatóide e doença de Crohn⁷⁹.

1.9.1 Variante rs17235416

Uma variante estudada é a deleção de quatro pares de base na região 3'UTR do gene *SLC11A1*, que foi previamente relacionada a tuberculose e doenças micobacterianas, sendo sugestivo marcador de infecção em tecido pulmonar⁶⁶.

1.10. Gene *SLC9A3* [*Solute carrier Family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3*]

O gene *SLC9A3* possui 17 éxons e está localizado na região 5p15.3. Até o momento, 889 variantes nesse gene foram descritas na literatura⁶⁵.

A proteína codificada por esse gene possui 834 aminoácidos e é uma transportadora de Na⁺ e de íons hidrogênio (H)⁷².

Por estar envolvida na regulação do pH, a partir da eliminação dos ácidos gerados pelo metabolismo ativo, a proteína *SLC9A3* desempenha papel na transdução de sinal, no qual um gradiente químico de íons é acionado para absorver o íon sódio. A proteína *SLC9A3* está localizada nos epitélios do intestino delgado e rins, sendo descrita na literatura como causa da disbiose microbiana em intestino de ratos⁸¹ e fator atuante nas alterações digestivas da FC⁷².

Variantes no gene *SLC9A3* foram associadas com a susceptibilidade a infecções bacterianas e gravidade da doença pulmonar, por interação com o gene *CFTR*, fornecendo evidências do seu efeito modulador na FC⁵⁰.

1.10.1 Variante rs17563161

O SNP rs17563161 já foi descrito como tendo relação com IM, gravidade da doença pancreática e pulmonar na FC^{50,72}.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Genotipar as variantes nos genes *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3* e associar com aos marcadores clínicos de gravidade da FC, principalmente da doença pulmonar.

2.2. Específicos

- Identificar os genótipos das variantes rs3788766, rs7512462, rs17235416 e rs17563161, respectivamente, nos genes *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3*;
- Determinar a frequência das variantes na amostra estudada;
- Verificar se há associação entre as variantes genéticas e os marcadores clínicos de gravidade dos pacientes com FC, considerando a amostra incluída no estudo e o agrupamento por classes de mutações identificadas no gene *CFTR*;
- Analisar a interação entre as variantes nos genes citados, mutações no gene *CFTR* e marcadores clínicos de gravidade dos pacientes com FC pelo teste de interação;

3. MATERIAIS E MÉTODO

O estudo teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob o parecer número 948.757.

3.1. Sujeitos

Foram incluídas na pesquisa 188 amostras de DNA genômico extraídas de leucócitos de sangue periférico de pacientes com FC atendidos no Ambulatório de Pediatria do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp. As amostras foram submetidas, anteriormente ao trabalho, aos protocolos manuais de extração de DNA com fenol-clorofórmio e cloreto de lítio, estando armazenadas desde então, sob o consentimento dos pacientes e/ou responsáveis (em caso de pacientes com menos de 18 anos) por assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, no Biorrepositório de DNA do Laboratório de Genética Molecular, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo.

Para o estudo não foram necessárias amostras de sujeitos saudáveis como grupo controle, já que, a comparação da gravidade clínica relacionada aos genes modificadores se baseia na relação entre os diferentes genótipos das variantes avaliadas com os marcadores de gravidade clínica obtidos. A coleta de dados clínicos ocorreu previamente a comparação realizada.

O diagnóstico dos pacientes com FC foi realizado pela presença de dois testes de suor com valores acima de 60 mEq/L, presença de mutações no gene *CFTR*, análise de biópsia retal e/ou potencial nasal para verificar a expressão da proteína CFTR, e finalmente a técnica de evaporímetro, para medir os valores de Cl⁻ no suor. As técnicas de diagnóstico dos pacientes são realizadas como procedimento de rotina, assim não foram declaradas em suas particularidades na dissertação.

3.2. Variáveis clínicas

As variáveis clínicas analisadas no estudo foram obtidas dos prontuários dos pacientes, sendo elas:

- Índice de massa corporal (IMC - kg/m^2) com cálculo segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS);
- Idade do paciente (meses) e idade ao diagnóstico (meses) para pacientes não incluídos na triagem neonatal;
- Idade do início dos sintomas pulmonares e digestivos (meses);
- Período até a primeira colonização pela *P. aeruginosa*;
- Microrganismos isolados na cultura de escarro, realizada a cada três meses e analisada no Laboratório de Patologia Clínica do HC-Unicamp. Foram incluídas no estudo a identificação das bactérias: *S. aureus*, *P. aeruginosa* mucoide e não mucoide, *Achromobacter xylosoxidans* e *Burkholderia cepacia*. Outros microrganismos não foram analisados por terem baixa frequência e pela impossibilidade para análise dos dados comparativos devido ao tamanho da amostra;
- Além da presença isolada de cada microrganismo, foram analisados a co-detecção da *P. aeruginosa* e do *S. aureus*, e o número total de bactérias isoladas na cultura de escarro;
- Escore de Shwachman-Kulczycki (SK) - mede o grau de comprometimento geral do paciente;
- Escore de Bhalla - escore tomográfico que mede a gravidade da doença pulmonar;
- Escore de Kanga - mede o grau de exacerbação pulmonar do paciente;
- Espirometria realizada no laboratório de Fisiologia Pulmonar - Centro de Investigação em Pediatria - FCM/Unicamp sob a supervisão da Dra. Maria Ângela Gonçalves de Oliveira Ribeiro. No estudo foram analisados os seguintes marcadores referentes a condição pulmonar dos pacientes: capacidade vital forçada (CVF); volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1); fluxo expiratório forçado entre 25 e 75% da CVF ($\text{FEF}_{25-75\%}$); razão entre VEF_1/CVF ;

fluxos expiratórios forçados em 25% (FEF_{25%}), 50% (FEF_{50%}) e 75% (FEF_{75%}) da CVF; fluxo expiratório máximo (FEF_{max}); volume de reserva expiratória (VRE). Além da análise dos valores da espirometria direta, foi realizada a análise da diferença entre os valores pré e pós o uso de broncodilatador inalatório (salbutamol - 400 mcg). Os valores analisados estão apresentados no estudo em porcentagem do predido;

- Saturação periférica de oxigênio da hemoglobina que é obtida em toda a consulta do paciente;
- Comorbidades dos pacientes com FC: polipose nasal, diabetes mellitus, IM, osteoporose e IP.

3.3. Genotipagem

Para a genotipagem das variantes rs3788766 (gene *SLC6A14*), rs7512462 (gene *SLC26A9*), rs17235416 (gene *SLC11A1*) e rs17563161 (gene *SLC9A3*), as amostras de DNA genômico dos pacientes foram submetidas a ensaios TaqMan[®] SNP Genotyping (Waltham, Massachusetts, EUA) no equipamento 7500 Real Time PCR Systems (Waltham, Massachusetts, EUA). A técnica utilizada se baseia na combinação da hibridação e da atividade exonucleásica 5' da DNA-polimerase, somada à detecção de fluorescência, o que confere elevada especificidade e sensibilidade nos resultados. O resultado da reação é tido como produto amplificado (amplicon) na curva de dissociação após a termociclagem^{82,83}.

No ensaio se utilizou de primers sintéticos para flanquear a sequência de interesse associados às sondas TaqMan[®] (Waltham, Massachusetts, EUA), específicas para cada alelo, que possuem um marcador fluorescente na extremidade 5' e um “quencher” (não fluorescente) na extremidade 3'. Cada um dos marcadores tem emissão em um espectro de onda, o que permite a discriminação dos alelos durante a reação, enquanto o “quencher” serve como um inibidor da fluorescência por captação. Durante a fase de extensão da reação, a enzima cliva apenas a sonda que é perfeitamente compatível, que na ausência do inibidor, libera o sinal,

desencadeando no aumento exponencial da fluorescência, a cada ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR), enquanto a sonda não correspondente permanece intacta e sem sinal^{82,83}.

Os *primers* foram adquiridos na empresa TaqMan[®] SNP Genotyping (Waltham, Massachusetts, EUA), sendo que o desenho dos mesmos é automaticamente projetado por um algoritmo desenvolvido pela empresa.

Os ensaios foram realizados em placas óticas de 96 poços, sendo 92 amostras de pacientes e quatro controles negativos sem DNA, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram lacradas com selos óticos específicos.

Para a reação de amplificação foram utilizados: 2 µL de DNA genômico (20 ng/µL); 6,25 µL de LuminoCt[®] qPCR ReadyMix (St. Louis, Missouri, EUA); 0,625 µL do ensaio (sonda e *primers*); 0,01µL de Dye; e 3,635 µL H₂O Milli-q em um volume final de 12,51 µL (considerou-se 12 µL). Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: dois minutos a 60°C, uma fase inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. A análise dos resultados foi realizada na plataforma online Thermo Fisher[®] Cloud 2.0 (Waltham, Massachusetts, EUA).

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versão 23.0. Para os dados com distribuição numérica foram realizados os testes paramétricos [Test T de *Student* - dois grupos/genótipos e análise de variância de uma via (ANOVA) - três grupos/genótipos] e não paramétricos de acordo com sua distribuição dos dados (Mann-Whitney - para dois grupos/genótipos e Kruskal-Wallis - para três grupos/genótipos). Para dados com distribuição categórica foram utilizados os testes Exato de Fisher (para dois grupos/genótipos) e o χ^2 corrigido pela razão de verossimilhança (para três grupos/genótipos). Em caso de significância entre os grupos para os testes ANOVA e Kruskal-

Wallis, a discriminação da diferença entre os grupos foi realizada no *software* MedCalc® para Windows, versão 16.1 (MedCalc® Software, Ostend, Belgium). Os dados com distribuição categórica e valor de p positivo tiveram análise adicional pelo *Odds Ratio* (OR), com valor do intervalo de confiança estipulado no OR considerando como parâmetro o estimador pela Série de Taylor ou Exato de Fisher ou Mid-P *test*. O cálculo do OR foi realizado no *software* OpenEpi versão 3.03^{a84}.

O valor de α adotado foi de 0,05 e β de 0,80 nas análises realizadas.

Após a realização dos testes considerando a amostra total de pacientes com FC, foi realizada análise considerando os grupos de mutações no gene *CFTR* [três grupos: (i) duas mutações de Classe I a III no gene *CFTR* identificadas - mutações de maior gravidade; (ii) uma mutação de Classe I a III e outra de Classe IV a VI no gene *CFTR* identificada (mutações com expressão de *CFTR* residual) ou não identificada até o momento; (iii) ausência de mutações de Classe I a III identificadas no gene *CFTR*]. A correção estatística por múltiplos testes foi realizada no estudo pelo teste FDR (*False Rate Discovery test*) para as variáveis que inicialmente apresentaram valor de p positivo. A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada no *software Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies* (OEGE)⁸⁵.

Para avaliar a interação genética entre as variantes e dados clínicos de nossa amostra, utilizou-se o modelo de *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), que é um modelo de análise de dados não paramétrica, genética e ambiental, para a identificação de interação não-linear entre atributos genéticos e ambientais. Para ajustar os resultados para comparações múltiplas, realizamos o *MDR permutation test* em nossa amostra totalizando 100.000 permutações⁸⁶.

O poder amostral foi calculado pelo programa G*Power vs 3.1, considerando o erro α de 0,05 e o β de 0,80; com efeito amostral médio (0,3 para Teste T; 0,25 para ANOVA e 0,3 para χ^2 corrigido pela razão de verossimilhança - com três genótipos analisados).

4. RESULTADOS

O número total de pacientes (188) incluídos no estudo possui poder amostral superior ao mínimo necessário calculado para a análise (159 para o teste ANOVA), considerando o erro α de 0,05 e o β de 0,80 e a menor frequência dentre as variantes na população (alelo G da variante rs17563161 no gene *SLC9A3*).

Com o intuito de facilitar a descrição da distribuição dos pacientes com FC incluídos no estudo foi realizado agrupamento levando em consideração as possibilidades de genótipos no gene *CFTR*, a saber: (i) duas mutações identificadas no gene *CFTR* de Classe I, II ou III, designado como grupo MI/MI; (ii) apenas uma mutação identificada no gene *CFTR* de Classe I, II e III associada a uma mutação de *CFTR* identificada de Classe IV, V e VI ou nenhuma mutação identificada, designado como grupo MI/MNI; (iii) um ou duas mutações de *CFTR* identificadas de Classe IV, V e VI ou nenhuma mutação identificada no gene *CFTR*, designado como grupo MNI/MNI, conforme apresentado, juntamente com a frequência de cada mutação na **Tabela 1**.

4.1. Caracterização da amostra

Dentre os pacientes selecionados para a análise, 92,3% eram caucasóides (auto-declarado). Esse dado corrobora com outros estudos por se tratar de uma doença com ancestralidade Europeia e, apesar da alta miscigenação de etnias encontrada no Brasil, há importante contribuição genética de imigrantes europeus no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste.

Não houve diferença em relação ao sexo dos pacientes da amostra, sendo 48,5% do sexo masculino. A distribuição está relacionada, provavelmente, à herança genética apresentada pela FC, que é do tipo autossômica. Todos os marcadores clínicos de gravidade da FC avaliados, com distribuição de dados categóricos e numéricos estão descritos na **Tabela 2**.

Os resultados apresentados são referentes apenas às associações positivas encontradas no estudo. Todos os valores referentes à análise estatística podem ser encontrados no apêndice.

A frequência dos genótipos para as variantes rs3788766 e rs17563161, respectivamente nos genes *SLC6A14* e *SLC9A3*, descrita na **Tabela 3** está fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$); enquanto as variantes rs7512462 e 17235416 nos genes *SLC26A9* e *SLC11A1* estão em equilíbrio ($p > 0,05$). Como nossa casuística é composta de pacientes com FC de um centro de referência, o fato das variantes estudadas nos genes *SLC6A14* e *SLC9A3* estarem fora de equilíbrio de Hardy-Weinberg reflete a ação de alguma força evolutiva, que deve estar atuando igualmente entre todos os pacientes, portanto, não invalida um estudo de associação com relação a gravidade da doença.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com fibrose cística para o genótipo do gene *CFTR* e classes de mutações identificadas*

Genótipo	N	%	Grupo de pacientes
-/-	40	21,5	Pacientes sem
V562I/-	1	0,5	mutação identificada
G576A/R668C	1	0,5	no gene <i>CFTR</i> , ou
D1152H/-	1	0,5	com uma ou duas
p.Glu528G>A/TG11-5T	1	0,5	mutações pertencentes
			as Classes IV, V ou VI
F508del/-	33	17,7	
G542X/-	1	0,5	Pacientes com uma
G542X/P205S	1	0,5	mutação no gene
G542X/R334W	1	0,5	<i>CFTR</i> pertencente a
622-2A>G/711+1G>T	1	0,5	Classe I, II ou III, e
G542X/I618T	1	0,5	uma mutação não
D614G/-	1	0,5	identificada ou de
F508del/D1152H	1	0,5	mutação de Classe IV,
F508del/R334W	1	0,5	V ou VI
R334W/R334W	1	0,5	
F508del/F508del	36	30,6	
F508del/G542X	13	7	
F508del/N1303K	4	2,2	
F508del/R1162X	5	2,7	
F508del/R553X	2	1,1	
F508del/1584- 18672pbA>G	1	0,5	
F508del/c.1717-1G>A	2	1,1	
3120+1G>A/R1066C	1	0,5	
F508del/2183AA>G	1	0,5	Pacientes com duas
F508del/2184insA	1	0,5	mutações
F508del/ 6B-16 <i>exon</i> <i>duplication</i>	1	0,5	identificadas no gene
F508del/G85E	1	0,5	<i>CFTR</i> pertencentes a
F508del/S549R (T>G)	1	0,5	Classe I, II e/ou II
G542X/2183AA>G	1	0,5	
G542X/R1162X	1	0,5	
A561E/A561E	1	0,5	
F508del/R1066C	1	0,5	
F508del/1812-1G>A	2	1,1	
R1066C/R334W	1	0,5	
R1162X/R1162X	1	0,5	
2183AA>G/2183AA>G	1	0,5	
3120+1G>A/3120+1G>A	1	0,5	

N, tamanho da amostra; *CFTR*, *cystic fibrosis transmembrane regulator*.

Tabela 2. Análise descritiva dos marcadores clínicos e laboratoriais dos pacientes com fibrose cística.

Variáveis	Distribuição*
Sexo (masculino)	82/169 (48,5%)
Raça (caucasóide)	155/168 (92,3%)
Idade (anos)	163; 15,87 ± 14,41; 11,67 (0,25 a 77,67)
Início sintomas (meses)	152; 23,24 ± 85,68; 2 (0 a 720)
Diagnóstico (meses)	154; 74,32 ± 150,54; 12,50 (0 a 833)
Início sintomas digestivos (meses)	138; 27,98 ± 89,08; 3 (0 a 720)
Início sintomas pulmonares (meses)	149; 28,91 ± 87,57; 4 (0 a 720)
Índice de massa corpórea	166; 17,56 ± 4,35; 16,42 (6,50 a 34,60)
Polipose nasal (presença)	25/161 (15,5%)
Diabetes mellitus (presença)	30/161 (18,6%)
Osteoporose (presença)	28/161 (17,4%)
Insuficiência pancreática (presença)	135/162 (83,3%)
Íleo meconial (presença)	21/161 (13%)
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	124; 80,61 ± 143; 23,50 (2 a 872)
<i>P. aeruginosa</i> mucóide (presença)	69/162 (42,6%)
<i>P. aeruginosa</i> não mucóide (presença)	101/162 (62,3%)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (presença)	15/162 (9,3%)
<i>Burkholderia cepacia</i> (presença)	26/162 (16%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (presença)	132/162 (81,5%)
SaO ₂	158; 95,42 ± 3,70; 96 (66 a 99)
Escore de Bhalla	95; 8,67 ± 4,89; 9 (0 a 23)
Escore de Kanga	105; 18,72 ± 5,80; 17 (10 a 40)
Escore de Shwachman-Kulczycki	109; 65,27 ± 15,78; 65 (20 a 95)
CVF	131; 72,63 ± 22,98; 77 (27 a 121)
VEF ₁	131; 60,95 ± 24,43; 62 (19 a 112)
VEF ₁ /CVF	131; 78,99 ± 14,08; 80 (45 a 107)
FEF _{25%}	120; 59,76 ± 30,38; 57 (7 a 138)
FEF _{50%}	120; 44,53 ± 28,61; 42,5 (5 a 126)
FEF _{75%}	120; 35,95 ± 28,19; 27,5 (4 a 142)
FEF _{25-75%}	130; 46,62 ± 31,49; 38 (7 a 150)
FEF _{max}	109; 75,26 ± 24,07; 73 (25 a 134)
VRE	107; 78,25 ± 46,45; 69 (3 a 208)
Pós broncodilatador	
CVF	112; 1,46 ± 8,36; 1 (-17 a 32)
VEF ₁	112; 3,77 ± 8,35; 3 (-12 a 48)
VEF ₁ /CVF	103; 2,64 ± 7,38; 3 (-19 a 32)
FEF _{25%}	97; 10,73 ± 24,53; 6 (-45 a 110)
FEF _{50%}	97; 15,40 ± 26,13; 13 (-41 a 114)
FEF _{75%}	97; 19,93 ± 47,81; 16 (-64 a 235)
FEF _{25-75%}	111; 12,62 ± 28,08; 13 (-51 a 117)
FEF _{max}	98; 3,72 ± 14,31; 3 (-42 a 69)
VRE	92; 27,85 ± 105,52; 1 (-90 a 670)

* Os dados com distribuição categórica estão apresentados da seguinte forma: n da variável / N total (porcentagem); os dados com distribuição numérica estão apresentados da seguinte forma: tamanho da amostra; média ± desvio padrão; mediana (mínimo a máximo). SaO₂, saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina no sangue; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25 % da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória. Os dados da espirometria estão apresentados em porcentagem do valor predito.

Tabela 3. Distribuição de genótipos e alelos das variantes dos genes *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3* (rs3788766, rs7512462, rs17235416 e rs17563161, respectivamente) nos pacientes com fibrose cística.

Variante (gene)	Genótipo	Número (%)	Alelo	Número (fa)	χ^2	*p-value
rs3788766 (<i>SLC6A14</i>)	CC	39 (21,4)	C	121 (0,33)	39,81	< 0,05
	CT	43 (23,6)	T	243 (0,67)		
	TT	100 (54,9)	Total	364		
	Total	182				
rs7512462 (<i>SLC26A9</i>)	CC	42 (23,2)	C	170 (0,47)	0,39	> 0,05
	CT	86 (47,5)	T	192 (0,53)		
	TT	53 (29,3)	Total	362		
	Total	181				
rs17235416 (<i>SLC11A1</i>)	TG/TG	165 (90,2)	TG	347 (0,95)	0,58	> 0,05
	TG/del	17 (9,3)	Del	18 (0,05)		
	Del/del	1 (0,5)	Total	365		
	Total	183				
rs17563161 (<i>SLC9A3</i>)	AA	2 (1,1)	A	68 (0,18)	4,34	< 0,05
	AG	64 (34,6)	G	302 (0,82)		
	GG	119 (64,3)	Total	370		
	Total	185				

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *SLC26A9*, Solute carrier family 26 member 9; *SLC11A1*, Solute carrier family 11 member 1; *SLC9A3*, Solute carrier family 9 member A3; χ^2 , qui-quadrado; fa, frequência absoluta.
* Os valores de χ^2 e P são referentes ao cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.2. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com a gravidade da fibrose cística

Os valores de p para as associações realizadas para a variante rs3788766 estão descritos nos **Apêndice 1**, **Apêndice 2**, **Apêndice 3** e **Apêndice 4**. Na **Tabela 4** está apresentada a associação com o sexo do paciente, sendo o genótipo TT mais frequente em pacientes do sexo masculino; na **Tabela 5** está descrita a associação com as bactérias isoladas na cultura de rotina diagnóstica e na **Tabela 6** está descrita a associação com o tempo para início dos sintomas pulmonares, sendo, ainda, que pacientes com mutações mais graves no gene *CFTR* e o rs3788766*T apresentaram maior prevalência de osteoporose, diabetes mellitus, IP e pior IMC,

conforme apresentado nas **Tabela 7** e **Tabela 8**. Na **Tabela 9**. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com o escore de Bhalla e marcadores obtidos na prova de função pulmonar realizada pela espirometria nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo. está apresentada a associação com o escore de Bhalla e com os marcadores da prova de função pulmonar avaliados pela espirometria.

Tabela 4. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Grupo			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Feminino	Masculino	Total			
MI/MI	CC	5	12	17	< 0,001 (0,001)	0,292 - 0,286	0,09 a 0,921^b - 0,116 a 0,704^b
	CT	22	0	22			
	TT	18	28	46			
	Total	45	40	85			
MI/MNI	CC	4	9	13	< 0,001 (0,001)	0,382 - 0,198	0,072 a 1,696 ^a - 0,058 a 0,685^b
	CT	13	0	13			
	TT	6	16	22			
	Total	23	25	48			
MNI/MNI	CC	2	4	6	0,023 (0,023)	0,378 - 0,530	0,029 a 3,199 ^a - 0,086 a 2,88 ^a
	CT	5	0	5			
	TT	10	11	21			
	Total	17	15	32			
Total	CC	11	25	36	< 0,001 (0,001)	0,327 - 0,303	0,148 a 0,721^b - 0,159 a 0,576^b
	CT	40	0	40			
	TT	34	55	89			
	Total	85	80	165			

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III. ^a, estimador de máxima verossimilhança de *Odds Ratio* pelo teste Exato de Fisher; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 5. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com a presença de bactérias isoladas na cultura de escarro dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucóide			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Sim	Não	Total			
MI/MI	CC	3	14	17	0,006 (0,024)	0,171 0,861 3,176	0,029 a 0,696^a 0,324 a 2,289 ^b 1,29 a 7,819^b
	CT	10	12	22			
	TT	27	17	44			
	Total	40	43	83			
<i>CFTR</i>	Genótipo	<i>Staphylococcus aureus</i>			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Sim	Não	Total			
MI/MI	CC	17	0	17	0,020 (0,07)	-	-
	CT	16	6	22			
	TT	36	8	44			
	Total	69	14	83			
MI/MNI	CC	12	0	12	0,035 (0,07)	-	-
	CT	12	1	13			
	TT	16	6	22			
	Total	40	7	47			
Total	CC	31	2	33	0,044 (0,126)	4,443 1	1,019 a 40,64^{a,c} -
	CT+TT	97	28	125			
	Total	128	30	158			
<i>CFTR</i>	Genótipo	<i>P. aeruginosa</i> não mucóide			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Sim	Não	Total			
MI/MI	CC	7	10	17	0,043 (0,172)	0,283 1	0,094 a 0,853^b -
	CT+TT	47	19	66			
	Total	54	29	83			

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^a, estimador de máxima verossimilhança de *Odds Ratio* pelo teste Exato de Fisher; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor; ^c, Ajuste por *Mid-P test* tendo intervalo de confiança de 1,149 a 29,1. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 6. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com o tempo de início dos sintomas pulmonares dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Início do sintoma pulmonar			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		≤ 4 meses	> 4 meses	Total			
MI/MI	CC	4	11	15	0,036 (0,144)	3,524 0,654	1,229 a 10,1^b 0,267 a 1,6 ^b
	CT	14	7	21			
	TT	17	26	43			
	Total	35	44	79			

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^a, estimador de máxima verossimilhança de *Odds Ratio* pelo teste Exato de Fisher; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 7. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com o agrupamento para a categorização do índice de massa corpórea.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Índice de massa corpórea			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		M + MA	Outros	Total			
MI/MI	CC	0	17	17	0,008 (0,014)	-	-
	CT	1	21	22		0,246	0,005 a 1,931 ^a
	TT	10	34	44		10,92	1,423 a 497,5^{*,a,c}
	Total	11	72	83			
Total	CC	2	34	36	0,01 (0,02)	0,263	0,040 a 1,024 ^a
	CT	3	36	39		0,381	0,069 a 1,384 ^a
	TT	20	66	86		4,242	1,505 a 11,95^b
	Total	25	136	161			

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; M, magreza; MA, magreza acentuada; ^a, estimador de máxima verossimilhança de *Odds Ratio* pelo teste Exato de Fisher; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor; ^c. Ajuste por *Mid-P test* tendo intervalo de confiança de 1,702 a 250,5. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 8. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com a presença de comorbidades nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Osteoporose			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Presença	Ausência	Total			
Total	CC	7	26	33	0,039 (0,156)	1,4	0,535 a 3,664 ^b
	CT	2	37	39		0,203	0,022 a 0,883^a
	TT	18	67	85		1,881	0,787 a 4,493 ^b
	Total	27	130	157			
<i>CFTR</i>	Genótipo	Insuficiência pancreática			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Presença	Ausência	Total			
MNI/MNI	CC	4	0	4	0,034 (0,136)	-	-
	CT	1	3	4		0,295	0,005 a 4,285 ^a
	TT	9	11	20		0,504	0,061 a 3,452 ^a
	Total	14	14	28			

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^a, estimador de máxima verossimilhança de *Odds Ratio* pelo teste Exato de Fisher; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 9. Associação da variante rs3788766 no gene *SLC6A14* com o escore de Bhalla e marcadores obtidos na prova de função pulmonar realizada pela espirometria nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

Marcador	Grupo	Genótipo	N	Média	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	5%	95%	p-value (p ^c)
Bhalla	Total	CC	23	7,913	3,63	8	0	17	6,34	9,48	0,047 (0,188) ^a
		CT	21	6,571	4,59	7	0	16	4,48	8,66	
		TT	48	9,563	5,15	9	0	23	8,07	11,06	
FEF _{max}	Total	CC	23	88,087	24,44	87	48	134	77,52	98,66	0,041 (0,164) ^b
		CT	29	73,59	18,99	73	33	102	66,36	80,81	
		TT	54	72,130	24,88	70,50	25	131	65,34	78,92	
FEF _{50%} pós BD	MI/MNI	CC	5	33,80	17,99	43	8	49	11,46	56,14	0,033 (0,132)
		CT+TT	22	10,545	24,22	10,50	-41	51	-0,20	21,29	
FEF _{max}	MNI/MNI	CC	3	92,333	7,57	89	87	101	73,52	111,14	0,036 (0,072)
		CT+TT	9	57,667	23,58	63	25	92	39,54	75,79	
VEF ₁ /CVF pós BD	Total	CC	21	5,143	5,97	4	-6	23	2,43	7,86	0,044 (0,152)
		CT+TT	79	2,038	7,37	2	-19	32	0,39	3,69	
FEF _{max}	MI/MNI	TT	11	72,182	24,42	69	42	124	55,78	88,59	0,028 (0,112)
		CT+CC	15	77,733	23,44	73	33	120	64,75	90,72	
FEF _{25%}	Total	TT	62	55,14	31,76	52	8	138	47,08	63,21	0,031 (0,124)
		CT+CC	55	65,836	28,16	74	7	136	58,22	73,45	

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; SD, desvio padrão; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; BD, broncodilatador. ^a, o genótipo TT ≠ CC e CT; ^b, o genótipo CC ≠ TT e CT. O intervalo de confiança apresentado está associado aos valores da média. Análise estatística realizada pelos testes de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

4.3. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com a gravidade da fibrose cística

Os valores de p para as associações realizadas para a variante rs7512462 estão descritos nos **Apêndice 5**, **Apêndice 6**, **Apêndice 7** e **Apêndice 8**. Na **Tabela 10** está apresentada a associação com a idade do paciente com FC, sendo o alelo T mais frequente em pacientes com idade $\leq 11,67$; na **Tabela 11** está descrita a associação com o sexo do paciente, e na **Tabela 12** com a identificação da *B. cepacia*.

Na **Tabela 13** está apresentada a associação com os marcadores da prova de função pulmonar avaliada pela espirometria para a população que inclui todos os pacientes do estudo. Na **Tabela 14** está descrita a associação com o escore de SK e com marcadores da prova de função pulmonar avaliados pela espirometria, em pacientes com uma mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III ou nenhuma mutação identificada no gene *CFTR*.

Tabela 10. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com a idade dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Idade			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		$\leq 11,67$	$> 11,67$	Total			
Total	CC	11	9	20	0,026 (0,104)	0,883	0,320 a 2,436 ^b
	CT	16	17	33			
	TT	20	9	29			
	Total	47	35	82			

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 11. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Sexo			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Feminino	Masculino	Total			
MI/MI	CC	15	6	21	0,049	2,931	1,007 a 8,532^b
	CT+TT	29	34	63	(0,196)	1	-
	Total	44	40	84			

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 12. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com a presença de *Burkolderia cepacia* nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	<i>Burkolderia cepacia</i>			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Sim	Não	Total			
MNI/MNI	CC+CT	0	22	22	0,04	-	-
	TT	2	4	6	(0,16)	-	-
	Total	2	26	28			

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MNI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 13. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com os marcadores da prova de função pulmonar realizada pela espirometria nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo. Na análise foi desconsiderado as mutações no gene *CFTR*.

Marcador	Genótipo	N	Média	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	5%	95%	p-value (p ^c)
VEF ₁	CC	30	70,30	27,32	73	21	112	60,10	80,50	0,047 (0,188) ^a
	CT	66	57,136	22,39	57	21	110	51,63	62,64	
	TT	31	62,71	23,92	62	19	112	53,94	71,48	
VEF ₁ /CVF	CC	30	84,10	14,74	85,5	45	103	78,60	89,61	0,022 (0,088) ^b
	CT	66	76,67	12,87	77	50	101	73,50	79,83	
	TT	31	79,29	13,86	81	50	104	74,21	84,37	
FEF _{50%}	CC	27	56,259	32,96	54	5	126	43,22	69,30	0,038 (0,152) ^c
	CT	60	38,733	25,92	35	6	120	32,04	45,43	
	TT	29	47,72	27,63	47	7	116	37,21	58,23	
FEF _{25-75%} total	CC	30	61,633	36,80	61	7	150	47,89	75,38	0,016 (0,064) ^d
	CT	65	39,95	28,18	33	7	120	32,97	46,94	
	TT	31	48,45	29,38	46	7	112	37,68	59,23	
CVF	CC	30	79,833	26,13	83,50	27	118	70,08	89,59	0,043 (0,156)
	CT+TT	97	71,196	21,20	73	28	121	66,92	75,47	
FEF _{25%}	CT	65	69,39	20,82	67	28	111	64,23	74,54	0,012 (0,048)
	CC+TT	62	77,27	23,93	80	27	121	71,20	83,35	
FEF _{75%}	CT	52	28,058	21,02	23	4	96	22,21	33,91	0,008 (0,032)
	CC+TT	56	44,496	32,13	34	6	142	35,84	53,05	
VRE	CT	50	67,86	41,43	63,50	6	172	56,09	79,63	0,023 (0,092)
	CC+TT	53	89,377	49,50	79	3	208	75,73	103,02	

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; SD, desvio padrão; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; VRE, volume de reserva expiratória; BD, broncodilatador. ^{a, b, c, d}, o genótipo CC ≠ CT e TT e o CT ≠ CC e TT. O intervalo de confiança apresentado está associado aos valores da média. Análise estatística realizada pelos testes de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 14. Associação da variante rs7512462 no gene *SLC26A9* com os marcadores da prova de função pulmonar realizada pela espirometria nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

Marcador	Grupo	Genótipo	N	Média	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	5%	95%	p-value (p ^c)
VEF ₁ pós BD	MI/MNI	CC	8	0,375	5,18	-1	-8	9	-3,96	4,71	0,011 (0,044)^a
		CT	15	1,20	6,42	3	-12	9	-2,35	4,75	
		TT	7	8,286	3,35	8	4	13	5,18	11,39	
FEF _{25-75%} pós BD	MI/MNI	CC	8	3,5	20,95	-1,5	-25	43	-14,01	21,01	0,008 (0,032)^b
		CT	15	1,733	21,98	4	-40	37	-10,44	13,91	
		TT	7	36	17,27	36	9	65	20,03	51,97	
SK	MI/MNI	CC	6	79,167	7,36	80	65	85	71,44	86,89	0,019 (0,076)
		CT+TT	20	65	13,08	65	40	85	58,88	71,12	
FEF _{50%} pós BD	MI/MNI	TT	7	32,14	18,06	37	8	51	15,44	48,84	0,019 (0,076)
		CC+CT	20	8,80	24	10	-41	47	-2,48	20,08	
FEF _{75%} pós BD	MI/MNI	TT	7	36	31,36	33	-7	80	7	65	0,036 (0,144)
		CC+CT	20	1,95	34,22	4,5	-58	55	-14,06	17,97	
VEF ₁ /CVF	MNI/MNI	CT	16	71,56	13,79	72	51	97	64,22	78,91	0,023 (0,046)
		CC+TT	9	84,667	14,83	91	55	100	73,27	96,07	

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; SD, desvio padrão; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; BD, broncodilatador. ^{a, b}; o genótipo TT ≠ CC e CT. O intervalo de confiança apresentado está associado aos valores da média. Análise estatística realizada pelos testes de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

4.4. Associação da variante rs17235416 no gene *SLC11A1* com a gravidade da fibrose cística

Os valores de p para as associações realizadas para a variante rs17235416 estão descritos no **Apêndice 9**. Na **Tabela 15** está apresentada a associação com o sexo do paciente com FC, na **Tabela 16** está apresentada a associação com a identificação do *S. aureus*, e na **Tabela 17**, a associação com a SaO₂ na população que inclui todos os pacientes do estudo.

Tabela 15. Associação da variante rs17235416 no gene *SLC11A1* com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

CFTR	Genótipo	Sexo			p-value (p ^c)	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%
		Feminino	Masculino	Total			
MNI/MNI	Ausente	17	9	26	0,006	-	-
	Presente	0	6	6	(0,024)	-	-
	Total	17	15	32			

SLC11A1, Solute carrier family 11 member 1; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MNI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05.

Tabela 16. Associação da variante rs17235416 no gene *SLC11A1* com a identificação do *Staphylococcus aureus* nos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

CFTR	Genótipo	<i>Staphylococcus aureus</i>			p-value (p ^c)	Odds Ratio	Intervalo de confiança 95%
		Sim	Não	Total			
MI/MI	Normal	67	10	77	0,013	8,563	1,253 a 67,5^a
	Deleção	3	4	7	(0,052)	1	-
	Total	70	14	84			
Total	Normal	120	24	144	0,039	3,333	1,085 a 10,24^b
	Deleção	9	6	15	(0,078)	1	-
	Total	129	30	159			

SLC11A1, Solute carrier family 11 member 1; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^a, estimador de máxima verossimilhança de Odds Ratio pelo teste Exato de Fisher; ^b, Odds ratio e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 17. Associação da variante rs17235416 no gene *SLC11A1* com os valores da saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina (SaO₂) dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo. Na análise foi desconsiderado as mutações no gene *CFTR*.

Marcador	Genótipo	N	Média	SD	Mediana	Mínimo	Máximo	5%	95%	p-value (p ^c)
SaO ₂	Normal	140	95,37	3,64	96	66	99	94,76	95,98	0,010
	Deleção	15	96,40	4,17	98	83	99	94,09	98,71	(0,04)

SLC11A1, Solute carrier family 11 member 1; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; SD, desvio padrão; SaO₂, saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina. O intervalo de confiança apresentado está associado aos valores da média. Análise estatística realizada pelos testes de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

4.5. Associação da variante rs17563161 no gene *SLC9A3* com a gravidade da fibrose cística

Os valores de p para as associações realizadas para a variante rs17235416 estão descritos nos **Apêndice 10**, **Apêndice 11**, **Apêndice 12** e **Apêndice 13**. A **Tabela 18** apresentada a associação com o sexo do paciente com FC e a **Tabela 19**, a associação com o início dos sintomas digestivos.

Tabela 18. Associação da variante rs17563161 no gene *SLC9A3* com o sexo dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Sexo			p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		Feminino	Masculino	Total			
MI/MI	GA	21	10	31	0,031	2,688	1,075 a 6,724^b
	GG	25	32	57	(0,124)	1	-
	Total	46	42	88			

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Tabela 19. Associação da variante rs17563161 no gene *SLC9A3* com o início dos sintomas digestivos dos pacientes com fibrose cística incluídos no estudo.

<i>CFTR</i>	Genótipo	Digestivo		Total	p-value (p ^c)	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança 95%
		≤ 3 meses	> 3 meses				
MI/MI	AA	0	1	1	0,024 (0,096)	-	-
	GA	16	31	47		0,413	0,199 a 0,859^b
	GG	50	39	89		2,564	1,234 a 5,33^b
	Total	66	71	137			

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; *CFTR*, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; ^b, *Odds ratio* e intervalo de confiança com estimador pela Série de Taylor. Valores com associação positiva estão apresentados em negrito. Alpha= 0,05. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

4.6. Análise de interação gênica

Foi realizada análise de interação gênica com as variantes avaliadas no estudo. Os valores de p das análises estão apresentados no **Apêndice 13**.

Na **Tabela 20** estão apresentadas as interações significativas, com o sexo, IP e *P. aeruginosa* mucoide, obtidas na avaliação pela ferramenta *multifactor dimensionality reduction*.

As **Figura 3**, **Figura 5** e **Figura 7** ilustram a distribuição dos pacientes com FC de acordo com os diferentes genótipos para as variantes nos genes da família SLC e mutações no gene *CFTR*, e sua interação com o sexo, IP e infecção por *P. aeruginosa* mucoide, respectivamente, sendo que a combinação dos genótipos marcados em cinza representa a maior gravidade da doença. Nas **Figura 4**, **Figura 6** e **Figura 8**, a interação dos genes e suas variantes em resposta ao sexo dos pacientes, IP e infecção por *P. aeruginosa* mucoide, respectivamente, é apresentada em detalhes, bem como, a força de interação entre os genótipos e mutações no gene *CFTR*.

Tabela 20. Análise de interação das variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR* com o sexo, insuficiência pancreática e presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide avaliada pela ferramenta *multifactor dimensionality reduction* na amostra de pacientes com fibrose cística.

Sexo	Ratio	Training bal. acc.	Testing bal. acc.	CV consistency	P-value
rs3788766		0,7381	0,7381	10/10	0,0010
<i>CFTR</i> *rs3788766	1,05	0,7401	0,6940	7/10	0,0010
<i>CFTR</i> *rs3788766*rs7512462		0,7702	0,6973	8/10	0,0010
<i>CFTR</i> * rs3788766*rs7512462*rs17563161		0,8022	0,6967	10/10	0,0010
Insuficiência pancreática		Ratio	Training bal. acc.	Testing bal. acc.	CV consistency
<i>CFTR</i>	4,81	0,7303	0,6547	10/10	0,0780
<i>CFTR</i> *rs17563161		0,7631	0,7211	8/10	0,0060
<i>CFTR</i> *rs3788766*rs7512462		0,7970	0,6316	5/10	0,1600
<i>CFTR</i> *rs3788766*rs7512462*rs17563161		0,8384	0,5652	9/10	0,5330
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoide	Ratio	Training bal. acc.	Testing bal. acc.	CV consistency	P-value
<i>CFTR</i>	0,706	0,5828	0,5133	9/10	0,7980
<i>CFTR</i> *rs3788766		0,6472	0,5595	10/10	0,5170
<i>CFTR</i> *rs3788766*rs17563161		0,6990	0,5378	5/10	0,6470
<i>CFTR</i> *rs3788766*rs7512562*rs17563161		0,7767	0,6378	10/10	0,0500

SLC6A14, Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, Member 9; *SLC11A1*, Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1; região 2q35; *SLC9A3*, Solute carrier Family 9, subfamily A (*NHE3*, cation proton antiporter 3), member 3; *CFTR*, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; bal. acc., balance accuracy; CV, cross-validation consistency.

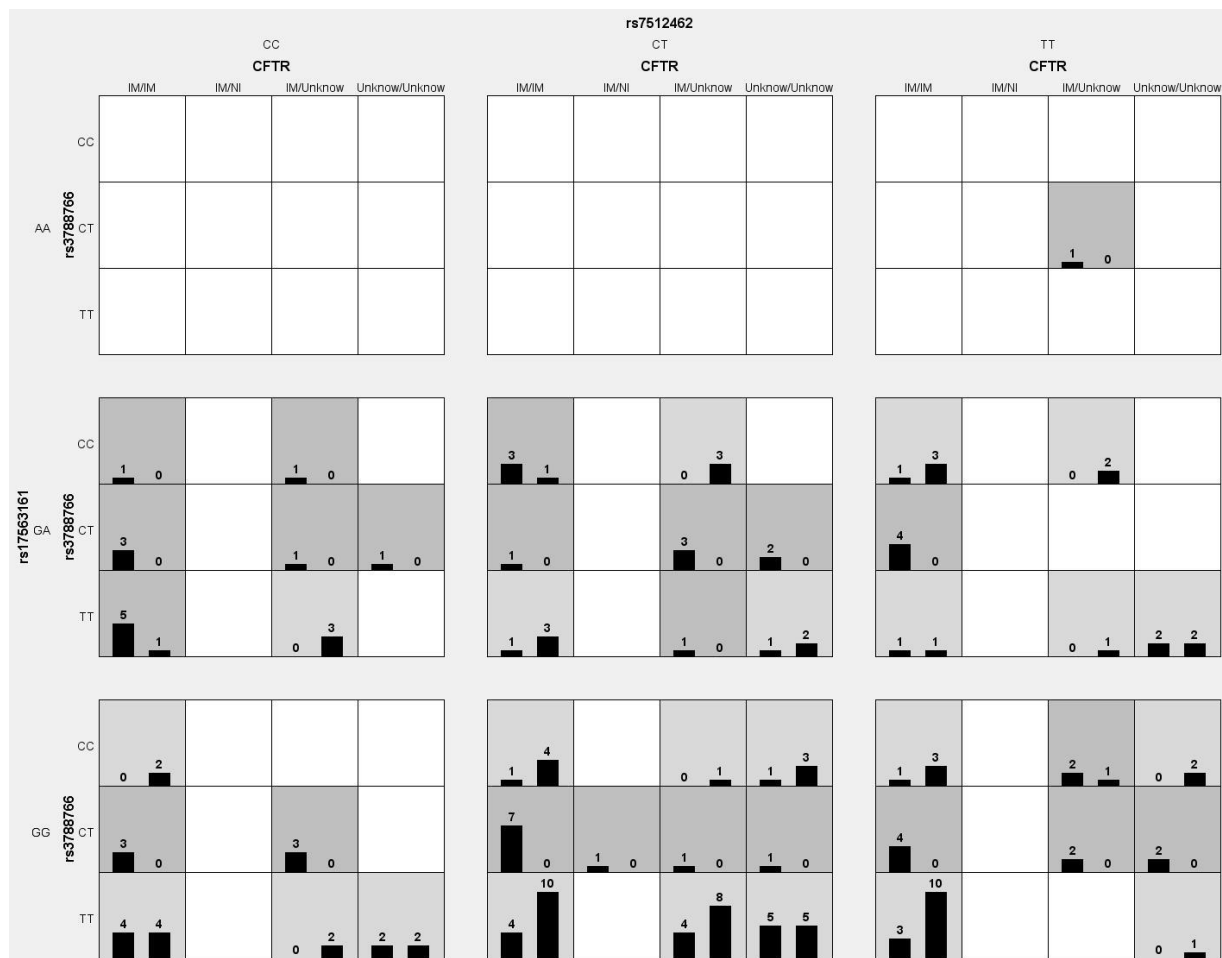


Figura 3. Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR* em relação ao sexo dos pacientes. Para o gene *CFTR* temos: IM, mutação identificada pertencente a Classe I, II e/ou III; *Unknown*, mutação não identificada no gene *CFTR* ou pertencente a Classe IV, V e/ou VI. Combinações de alto risco estão marcadas em cinza e as de baixo risco estão marcadas em branco. Na figura estão apresentadas todas as variantes avaliadas no estudo. O número na figura representa os pacientes com a combinação dos genótipos. Em cada quadrado, a primeira coluna representa o valor (0 - sexo feminino) e a segunda o valor (1 - sexo masculino). *SLC6A14*, Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, Member 9; *SLC11A1*, Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1; região 2q35; *SLC9A3*, Solute carrier Family 9, subfamily A (*NHE3*, cation proton antiporter 3), member 3; *CFTR*, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

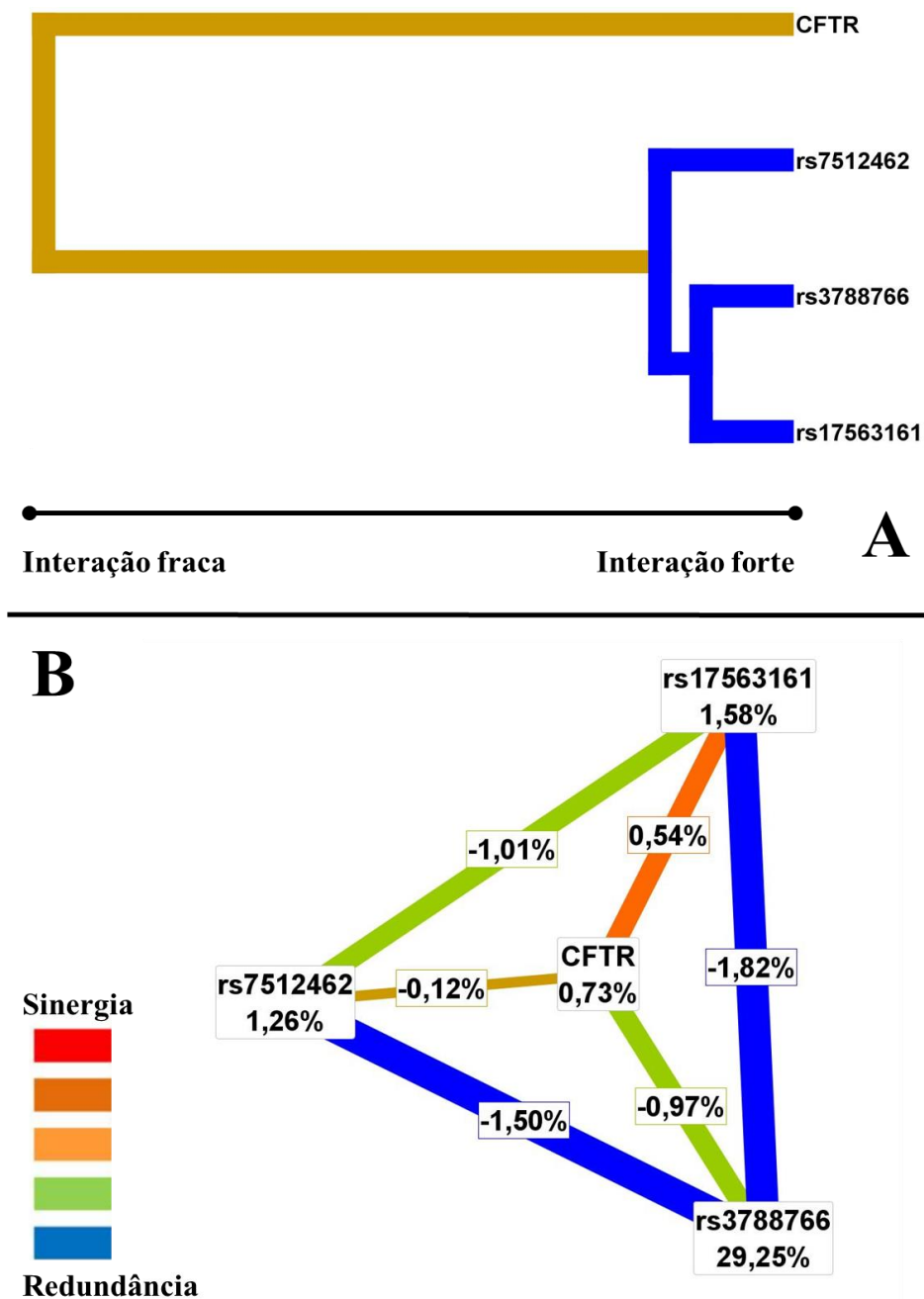


Figura 4. Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e suas variantes [rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR*] em resposta ao sexo dos pacientes com fibrose cística. **A.** Dendrograma com a interação dos genes e suas variantes em resposta ao sexo dos pacientes com fibrose cística. **B.** Gráfico de entropia que mede a força de diferentes genótipos e a interação entre eles, para os genes analisados na interação gene-gene com o sexo dos pacientes com fibrose cística. O poder da interação é mostrado pela distância entre os dois genes na figura A na direção horizontal. A força de interação considerando redundância/sinergia é mostrada na figura B pela intensidade de cor. *SLC6A14*, *Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14*; *SLC26A9*, *Solute Carrier Family 26, Member 9*; *SLC11A1*, *Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1*; região 2q35; *SLC9A3*, *Solute carrier Family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3*; *CFTR*, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*.

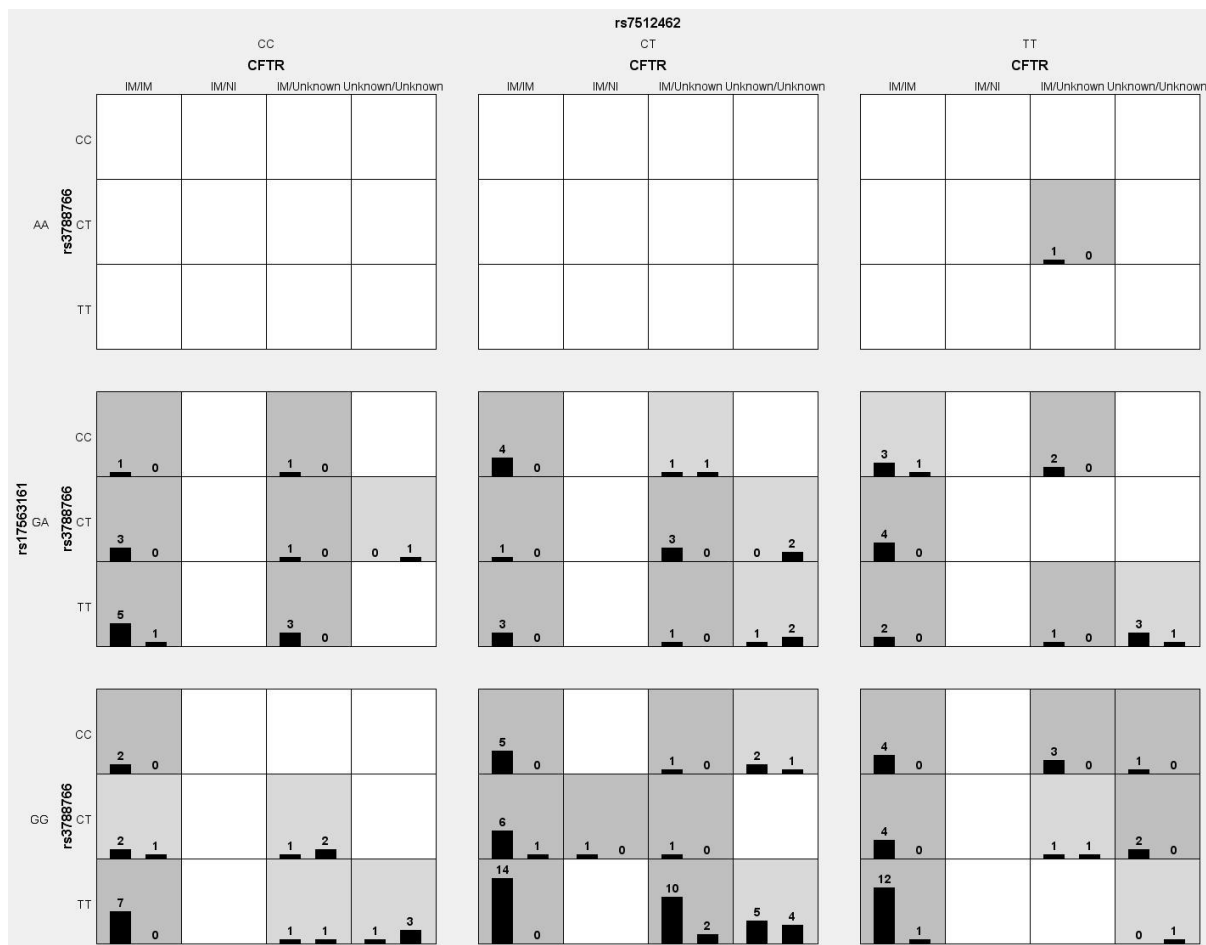


Figura 5. Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR* em relação a presença de insuficiência pancreática dos pacientes. Para o gene *CFTR* temos: IM, mutação identificada pertencente a Classe I, II e/ou III; Unknown, mutação não identificada no gene *CFTR* ou pertencente a Classe IV, V e/ou VI. Combinações de alto risco estão marcadas em cinza e as de baixo risco estão marcadas em branco. Na figura estão apresentadas todas as variantes avaliadas no estudo. O número na figura representa os pacientes com a combinação dos genótipos. Em cada quadrado, a primeira coluna representa o valor (0 - ausência de insuficiência pancreática) e a segunda o valor (1 - presença de insuficiência pancreática). *SLC6A14*, Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, Member 9; *SLC11A1*, Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1; região 2q35; *SLC9A3*, Solute carrier Family 9, subfamily A (*NHE3*, cation proton antiporter 3), member 3; *CFTR*, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

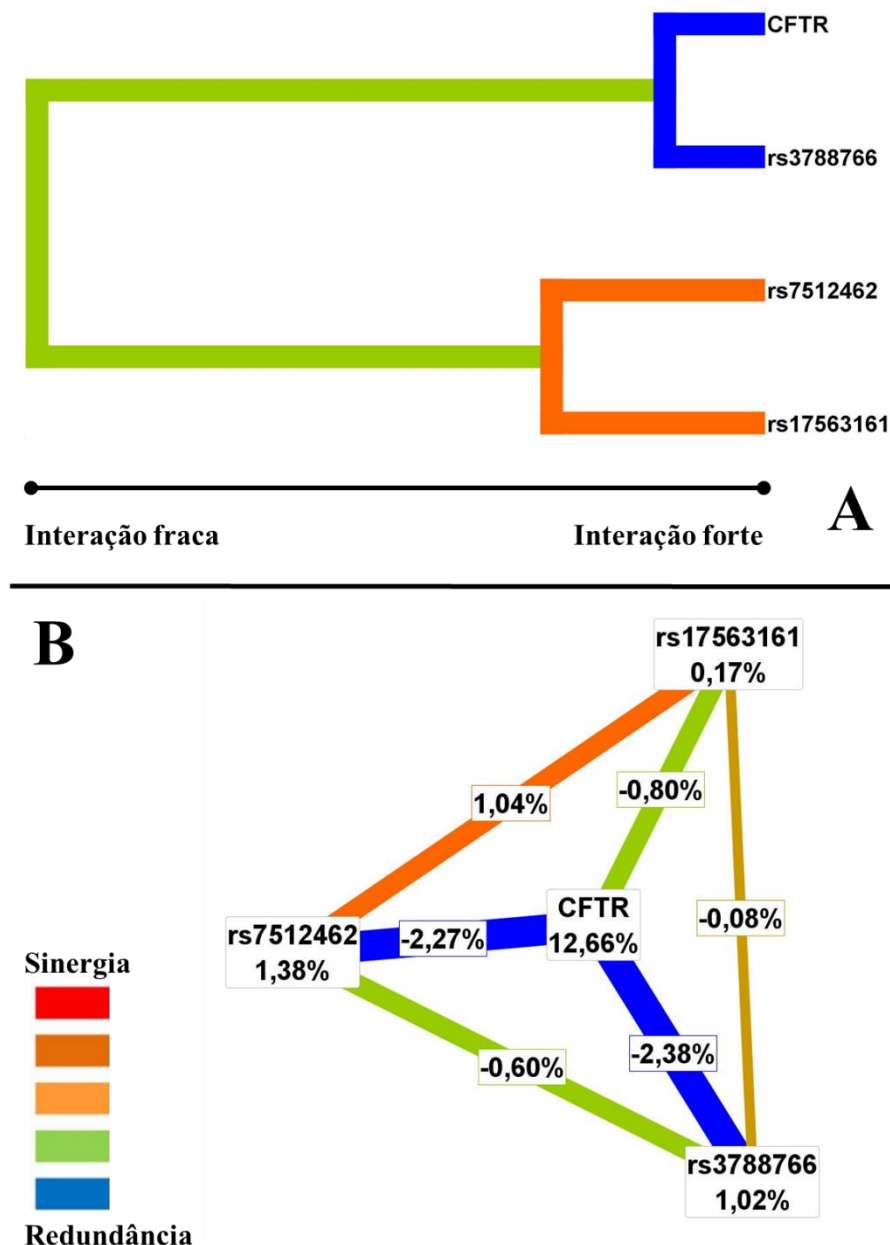


Figura 6. Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e suas variantes [rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR*] em resposta a presença de insuficiência pancreática nos pacientes com fibrose cística. **A.** Dendrograma com a interação dos genes e suas variantes em resposta presença de insuficiência pancreática nos pacientes com fibrose cística. **B.** Gráfico de entropia que mede a força de diferentes genótipos e a interação entre eles, para os genes analisados na interação gene-gene com presença de insuficiência pancreática nos pacientes com fibrose cística. O poder da interação é mostrado pela distância entre os dois genes na figura A na direção horizontal. A força de interação considerando redundância/sinergia é mostrada na figura B pela intensidade de cor. *SLC6A14*, *Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14*; *SLC26A9*, *Solute Carrier Family 26, Member 9*; *SLC11A1*, *Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1*; região 2q35; *SLC9A3*, *Solute carrier Family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3*; *CFTR*, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*.

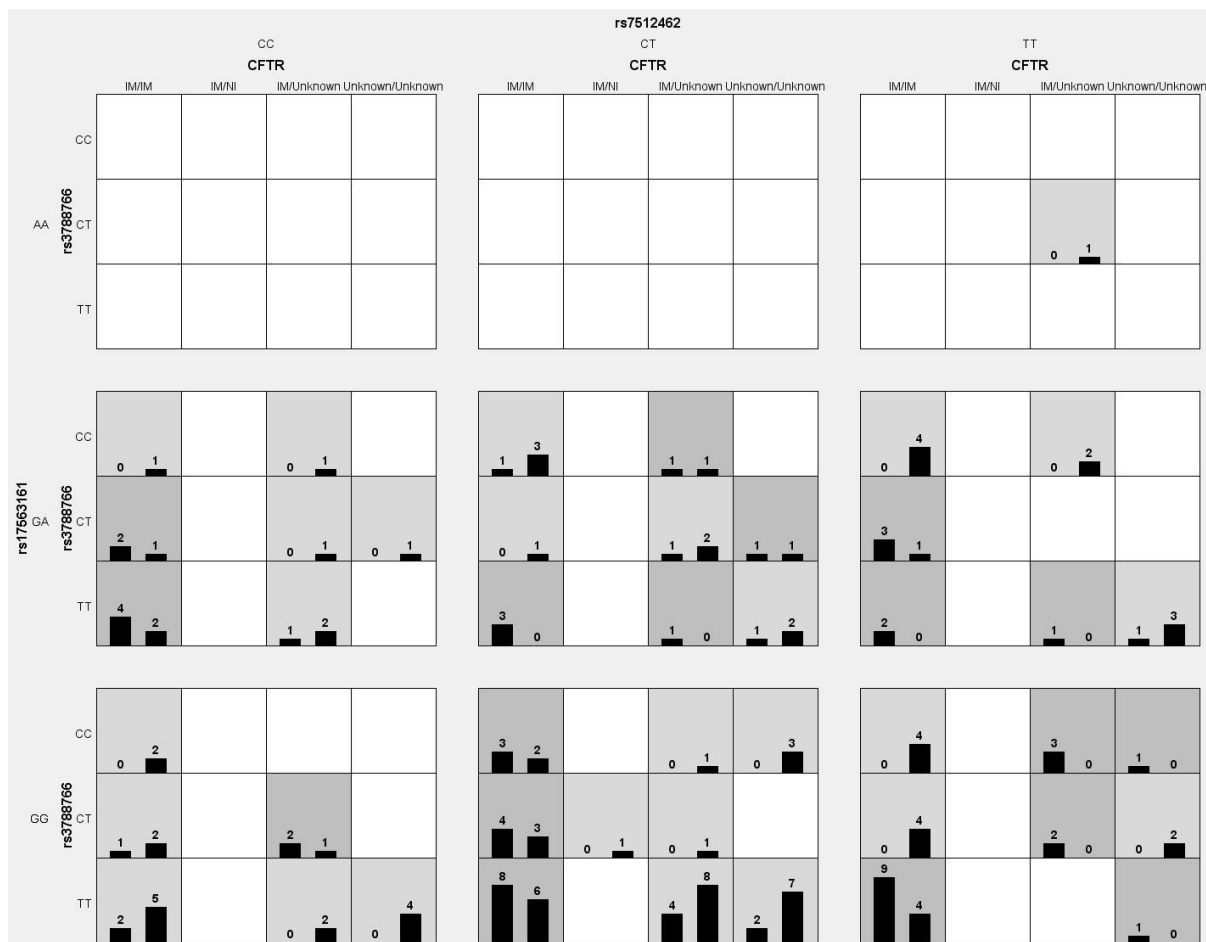


Figura 7. Distribuição dos pacientes com fibrose cística de acordo com os diferentes genótipos para as variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR* em relação a presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide nos pacientes. Para o gene *CFTR* temos: IM, mutação identificada pertencente a Classe I, II e/ou III; Unknown, mutação não identificada no gene *CFTR* ou pertencente a Classe IV, V e/ou VI. Combinações de alto risco estão marcadas em cinza e as de baixo risco estão marcadas em branco. Na figura estão apresentadas todas as variantes avaliadas no estudo. O número na figura representa os pacientes com a combinação dos genótipos. Em cada quadrado, a primeira coluna representa o valor (0 - ausência de *P. aeruginosa* mucoide) e a segunda o valor (1 - presença de *P. aeruginosa* mucoide). *SLC6A14*, Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, Member 9; *SLC11A1*, Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1; região 2q35; *SLC9A3*, Solute carrier Family 9, subfamily A (*NHE3*, cation proton antiporter 3), member 3; *CFTR*, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

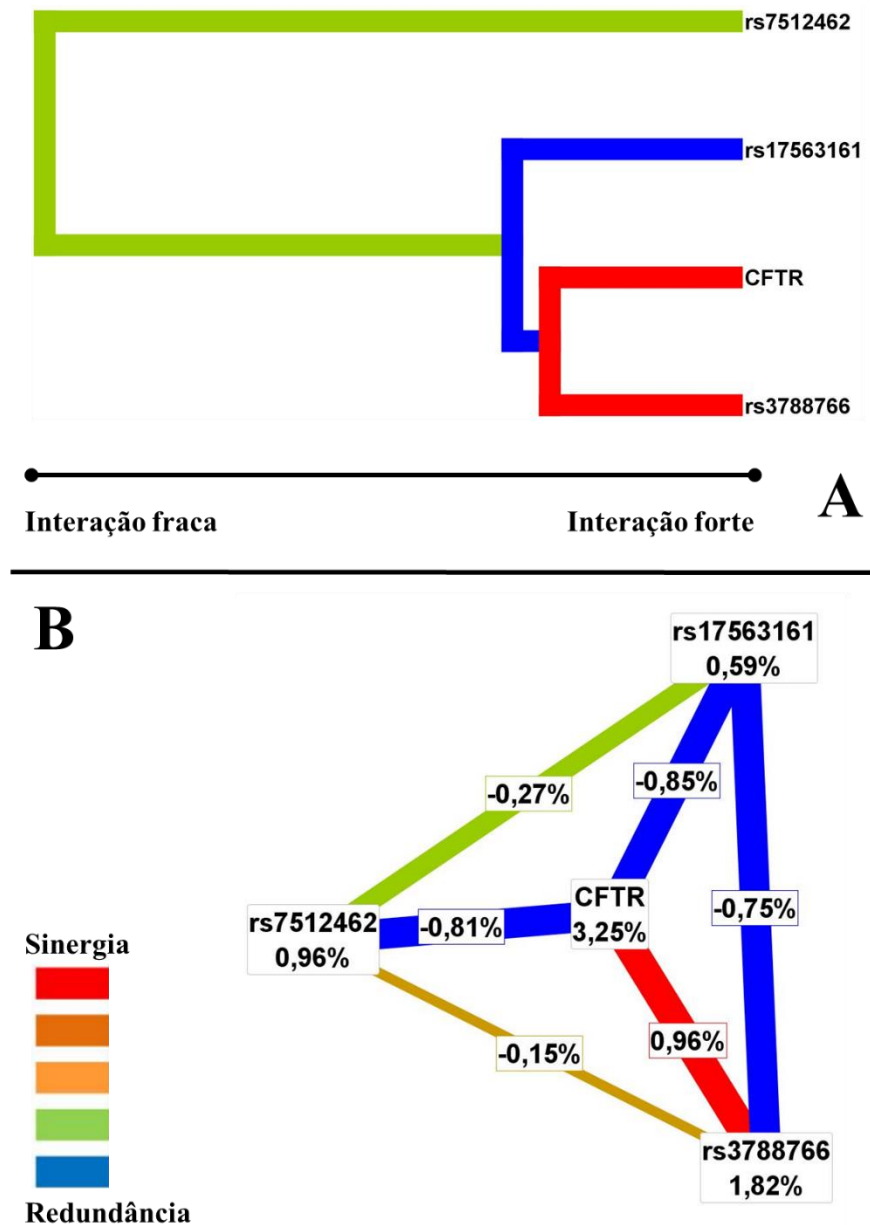


Figura 8. Dendrograma e gráfico da entropia com a interação dos genes e suas variantes [rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*), e mutações no gene *CFTR*] em resposta a presença de *Pseudomonas aeruginosa* mucoide nos pacientes com fibrose cística. **A.** Dendrograma com a interação dos genes e suas variantes em resposta presença de *P. aeruginosa* mucoide nos pacientes com fibrose cística. **B.** Gráfico de entropia que mede a força de diferentes genótipos e a interação entre eles, para os genes analisados na interação gene-gene com presença de *P. aeruginosa* mucoide nos pacientes com fibrose cística. O poder da interação é mostrado pela distância entre os dois genes na figura A na direção horizontal. A força de interação considerando redundância/sinergia é mostrada na figura B pela intensidade de cor. *SLC6A14*, *Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14*; *SLC26A9*, *Solute Carrier Family 26, Member 9*; *SLC11A1*, *Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1*; região 2q35; *SLC9A3*, *Solute carrier Family 9, subfamily A (NHE3, cation proton antiporter 3), member 3*; *CFTR*, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*.

5. DISCUSSÃO

Apesar da FC ser uma doença monogênica e com mutações no gene *CFTR* bem conhecidas e divididas em classes (mutações pertencentes a Classe I, II e III de maior gravidade em relação as de Classe IV, V e VI), a heterogeneidade de fenótipos e variabilidade clínica, mesmo entre pacientes com mutações idênticas, ou de mesma classe, é elevada e é um indicativo da complexidade em que se apresenta a doença. Essas informações reforçam a ideia de que a FC é modulada por uma influência pleitrópica de fatores genéticos e ambientais em sua evolução, principalmente na doença pulmonar.

Diante do crescente aumento da expectativa de vida dos pacientes com FC em reflexo de abordagens como diagnóstico precoce, surgimento de novas drogas ou melhora no tratamento multidisciplinar, novas perguntas são constantemente realizadas, sendo a busca pela identificação de novos marcadores clínicos para a doença uma maneira de tentar responde-las, uma vez que, há uma nova perspectiva pela abordagem individualizada⁷².

Nesse contexto, os genes candidatos a modificadores analisados foram selecionados por suas propriedades no metabolismo do organismo, como codificadores de canais de transporte, podendo atuar na variabilidade e progressão da FC, principalmente da doença pulmonar. Vale ressaltar que o gene *SLC6A14* codifica um canal de transporte para aminoácidos neutros e básicos, sódio-cloro dependente. O gene *SLC26A9* é codificador de canal de transporte de aníons, como numerosas funções que inclui a troca de cloro/bicarbonato e o co-transporte de sódio-aníons. O gene *SLC11A1* codifica um transportador bivalente de metal $Fe(2^+)$ e $Mn(2^+)$ envolvido no metabolismo do ferro e resistência natural às infecções de certos patógenos intracelulares. E, finalmente, o gene *SLC9A3* codifica um canal de sódio/hidrogênio, que quando alterado, reduz a obstrução intestinal em ratos com mutação no gene *CFTR*. A expressão dos genes selecionados está relacionada a proteína CFTR, e em todos os casos, ocorre expressão

pulmonar, sendo assim, plausível para estudos de associação com a gravidade da FC avaliada por marcadores clínicos e laboratoriais.

Considerando que o protocolo e a abordagem terapêutica dos pacientes com FC é a mesma para toda nossa casuística, o fator de variabilidade ambiental não foi motivo para ser incluído no estudo.

Resumidamente, no presente estudo, foi realizada a genotipagem de quatro variantes em quatro genes modificadores. Os genótipos obtidos foram associados com marcadores de gravidade clínica considerando o agrupamento dos pacientes com FC pelas classes de mutações de *CFTR*.

5.1. Variante rs3788766 no gene *SLC6A14*

A variante rs3788766 está posicionada no sítio de ligação de fator de transcrição, de tal forma que, os níveis da proteína SLC6A14 expressa podem ser afetados^{71,72}. Com a perda da proteína CFTR nos tecidos, o transporte de aminoácidos pela proteína SLC6A14, fica comprometido por consequência da função dependente de Cl⁻ que esse canal possui⁶⁵, conforme observado, pela primeira vez em células do íleo distal de coelhos, por Munk e Munk (1990)⁸⁷ e posteriormente confirmado por clonagem celular por Catriona e colaboradores (2008)⁸⁸.

Como a proteína SLC6A14 é expressa, principalmente no sistema digestório e pulmonar, com distribuição paralela a colonização bacteriana⁸⁸, sugere-se que desempenhe, no pulmão, papel de defesa por regulação do meio pela depuração de proteínas e consequente diminuição de nutrientes disponíveis para a colonização⁸⁹.

Nesse contexto, a SLC6A14 pode atuar na colonização/infecção, principalmente pela *P. aeruginosa*, que está associada ao declínio da função pulmonar e redução na sobrevivência^{72,88}.

Em estudo realizado no Canadá foram apresentados dados que apontam aumento no risco de infecção pulmonar devido a presença do alelo rs3788766*T⁷², estando de acordo com

a hipótese teórica apresentada. Em nossa amostra, essa relação foi evidenciada, tanto na infecção por *P. aeruginosa* mucoide, quanto na *P. aeruginosa* não mucoide, corroborando com o estudo anterior. Além disso, foi observado a associação com o escore de Bhalla e declínio dos marcadores da prova de função pulmonar que estão associados a maior gravidade da doença, demonstrando importância da validação dos achados anteriores em uma amostra, com dados clínicos e laboratoriais, resultados do acompanhamento de 30 anos em um único centro de referência.

Outra associação positiva encontrada em nosso estudo foi a relação do alelo rs3788766*T em pacientes com duas mutações no *CFTR* de Classe I, II ou III com o início precoce dos sintomas pulmonares (inferior a quatro meses), estando de acordo com o estudo citado anteriormente, sendo justificado pelo agravamento das condições clínicas e maior gravidade da doença^{72,88}.

Além disso, houve relação dos pacientes com duas mutações identificadas no gene *CFTR* pertencentes a Classe I, II e III e presença do alelo rs3788766*T com as comorbidades osteoporose e diabetes mellitus associada a FC, podendo denotar a influência direta da variabilidade genética, que condiciona maior ou menor risco para a presença de comorbidades. As comorbidades observadas na FC são decorrentes da variabilidade das mutações no gene *CFTR*, fatores ambientais e, finalmente, genes modificadores, sendo resultado de uma “rede” de interações de fatores ambientais e genéticos que deve ser considerada para a variabilidade apresentada na FC.

A relação do alelo mutado com risco para IM descrita por Sun e colaboradores⁷¹ e posteriormente por Li e colaboradores⁷² não foi validada em nossa casuística, possivelmente, decorrente do tamanho da amostra incluída em nosso estudo com IM.

5.2. Variante rs7512462 no gene *SLC26A9*

Responsável pelo transporte, preferencialmente de Cl^- e HCO_3^- , a proteína *SLC26A9* é um canal de ânions que possui interação física com a proteína *CFTR*, podendo aumentar a expressão funcional quando houver ação residual da mesma. Na doença pulmonar da FC, sugere-se um mecanismo mais complexo de modulação, visto que a *SLC26A9* é expressa nos tecidos do sistema respiratório, mas sua ação ainda não foi totalmente descrita⁵⁰.

Recentemente, o alelo rs7512462*C foi associado a melhor resposta ao Ivacaftor (VX-770 - $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$) em pacientes com FC e mutações como a G551D pela melhor resposta observada na função pulmonar. Além disso, a melhor resposta ao Lumacaftor (VX-809 - $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_5$) ocorreu em pacientes homozigotos F508del, que apresentavam o alelo rs7512462*C. Em ambos os casos, para a resposta estar presente se fez necessário a proteína *CFTR* na membrana plasmática⁸⁹, reforçando a hipótese de que deve haver mecanismos mais complexos modulando a gravidade da doença pulmonar.

Em outros estudos, a variante rs7512462 foi relacionada a presença de IP seguida de diabetes mellitus na FC⁷⁸, sendo também marcador para IM⁷². Os resultados publicados anteriormente não foram confirmados no nosso estudo.

Adicionalmente, foi descrito que o IRT circulante é um biomarcador da doença pancreática exócrina na FC estando elevado na maioria dos recém-nascidos com a doença. Nos pacientes com mutações graves no gene *CFTR*, o IRT diminui rapidamente nos primeiros anos de vida, refletindo danos pancreáticos progressivos. Consistente com a progressão, uma medida de IRT de recém-nascido menos elevada reflete em uma doença pancreática mais grave e maior risco para a diabetes associada a FC. Em estudo anterior, foi descrito que uma estimativa de IRT do recém-nascido mais baixa está associada ao maior risco de diabetes mellitus entre indivíduos com genótipos de *CFTR* grave. No estudo publicado, o aumento do IRT no nascimento foi associado com menor risco de diabetes em amostras do Canadá e Colorado

[OR= 0,30 (IC95%= 0,15 a 0,61) e 0,39 (IC95%= 0,18 a 0,81), respectivamente]⁷⁸.

Considerando que o genótipo para a variante rs7512462 é associada aos níveis de IRT ao nascimento na FC⁹⁰, observou-se evidências para apoiar uma contribuição causal do status pancreático exócrino no risco da diabetes na FC⁷⁸. No entanto, os resultados observados, em estudos anteriores, não foram encontrados em nossa amostra de pacientes com FC.

5.3. Variante rs1723516 no gene *SLC11A1*

O Fe(2⁺) é um metal essencial para o funcionamento de numerosas proteínas, e é amplamente encontrado em todo o sistema fisiológico, sendo dependente de homeostase adequada, para não se tornar tóxico ou prejudicial com seu excesso⁶⁶.

Por estar envolvido na codificação de transportadores bivalente de Fe(2⁺) e Mn(2⁺) para o interior de macrófagos e neutrófilos, a proteína SLC11A1 está relacionada com a resposta inflamatória aguda e resistência natural a infecções por certos patógenos intracelulares pela captação de Fe(2⁺)^{66,91}.

Quando a proteína SLC11A1 é “não funcional”, o acúmulo de íons pode ser favorável a replicação de agentes patológicos que vivem em biofilmes no trato respiratório, como por exemplo, a *P. aeruginosa*. A homeostase do pulmão ainda é pouco compreendida, porém, sugere-se que em decorrência da acidificação das vias aéreas, a disponibilidade de ferro é maior para os patógenos^{92,93}.

Em nossa amostra, foi identificada relação da variante rs17235416 com a infecção pelo patógeno *S. aureus*, o que sugere maior susceptibilidade a patógenos em decorrência da variação polimórfica estudada. Essa associação pode ser secundária ao processo anteriormente citado de funcionalidade da proteína no trato respiratório. Acreditamos que mais estudos, principalmente de expressão e abordagem direta de infecção/colonização do trato respiratório, devam ser realizados, para possibilitar melhor entendimento da complexa dinâmica observada.

5.4. Variante rs17563161 no gene *SLC9A3*

Sendo um transportador de sódio e hidrogênio, a proteína *SLC9A3* está envolvida na regulação do pH a partir da eliminação dos ácidos gerados pelo metabolismo ativo.

Apesar dos estudos na literatura serem escassos e sua função no pulmão não ter sido bem elucidada, descreve-se a proteína como uma possibilidade de equilíbrio osmótico compensatório, atuando na quantidade de muco em pacientes com FC⁹⁴.

Alterações na estrutura ou função da *SLC9A3*, em decorrência de variantes gênicas, podem ser um motivo para o mal funcionamento, e conseqüente, piora no quadro clínico dos pacientes, sendo associadas a susceptibilidade a infecções bacterianas e gravidade da doença pulmonar⁵⁰.

Em relação aos dados clínicos, baseado na literatura científica, anteriormente houve associação com o maior risco para o IM e para a doença pulmonar grave⁷². As associações encontradas em nosso estudo podem ser um retrato da gravidade secundária da doença, decorrente da variabilidade genética resultante da interação de múltiplos fatores, o que inclui a variante rs17563161.

5.5. Análise de Interação gênica

A análise de interação apontou para resultados significativos quanto a associação das variantes gênicas com presença de *P. aeruginosa* mucoide, denotando sua influência na maior gravidade do quadro clínico pulmonar, bem como, relação a IP, conforme discutido anteriormente. Além disso, houve resultado positivo em relação às variantes associadas ao sexo do paciente com FC, o que não foi bem elucidado, em nosso estudo, por não haver informações comparativas descritas na literatura. Os achados podem ser decorrentes de interações entre mecanismos moleculares até então desconhecidos.

Nosso grupo de pesquisa apresenta pioneirismo na utilização da ferramenta MDR para a determinação da interação gênica com marcadores de gravidade clínica da FC. Anteriormente, em estudo publicado por Marson et al. (2013), foi observado que o dano pulmonar na FC, avaliado pelo escore de Bhalla era resultado da seguinte interação: deleção dos genes *GSTM1* (*Glutathione S-transferase Mu 1*) e *GSTT1* (*Glutathione S-transferase Theta 1*), variante *GSTP1**+313A>G e Classes de mutações no gene *CFTR*⁵⁷. Além disso, outros estudos estão em fase de publicação e acreditamos que múltiplas vias metabólicas, associadas a diferentes variantes gênicas, em genes modificadores, estão associadas a gravidade clínica dos pacientes com FC.

6. CONCLUSÕES

- Há associação entre a variabilidade clínica e laboratorial da FC e a presença das variantes rs3788766, rs7512462, rs17235416 e rs17563161, nos genes *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC11A1* e *SLC9A3*, respectivamente, bem como interação entre os genes estudados em nossa amostra;
- Em decorrência da ausência de um número significativo de estudos com dados comparativos, as variantes nos genes da família *SLC* devem ser mais estudadas, futuramente, com o intuito de determinar, em outras amostras, como atuam na variabilidade da FC;
- As variantes devem ser avaliadas em outras doenças com aspectos comuns a FC;
- Como os genes da família *SLC* expressam proteínas que formam canais iônicos, seu uso como modelo terapêutico alternativo na FC, em relação a CFTR deve ser estimulado e melhor avaliado.

7. REFERÊNCIAS

- 1 Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 1999; 79(1): S3-S22.
- 2 Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:475-82.
- 3 Farber S. Pancreatic function and disease in early life v. pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life. *Arch Pathol.* 1944; 37:238.
- 4 Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome v. genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration etiology. *Am J Dis Child.* 1946; 72:62.
- 5 Andersen DH. Therapy and prognosis of fibrocystic disease of the pancreas. *Pediatr.* 1949; 3:406-17.
- 6 Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatr.* 1959; 23:545-59.
- 7 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analyses. *Science.* 1989; 245:1073-80.
- 8 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989; 245:1066-73.
- 9 Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989; 245:1059-65.
- 10 Geborek A, Hjelte L. Association between genotype and pulmonary phenotype in cystic fibrosis patients with severe mutations. *J Cyst Fibros.* 2011; 10(3):187-92.
- 11 Fitzsimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1993; 122(1):9-15.

- 12 Cystic Fibrosis Foundation. Disponível em: <http://www.cff.org>. [Acessado em: 30/01/17]
- 13 Picci L, Cameran M, Marangon O, Marzenta D, Ferrari S, Frigo AC *et al.* A 10-year large-scale cystic fibrosis carrier screening in the Italian population. *J Cyst Fibros.* 2010; 9:29-35.
- 14 Cutting GR. Modifier genes in mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1214:57-69.
- 15 Lubamba B, Dhooge B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into *CFTR* pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem.* 2012; 45(15):1132-44.
- 16 Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* 1985; 230(4729).
- 17 Braun AT, Farrell PM, Ferec C, Audrezet MP, Laxova A, Li Z *et al.* Cystic fibrosis mutations and genotype–pulmonary phenotype analysis. *J Cyst Fibros.* 2006; 5(1):33-41.
- 18 Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P *et al.* A *CFTR* potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med.* 2011; 365(18):1663-72.
- 19 Ribeiro JD, Ribeiro MAGO, Ribeiro AF. Controvérsias na fibrose cística - do pediatra ao especialista. *J Pediatr (Rio J).* 2002; 78(2):S171-S186:
- 20 Smith HC. Fertility in men with cystic fibrosis assessment, investigations and management. *Paediatr Respir Rev.* 2010; 11:80-3.
- 21 Dell'Edera D, Benedetto M, Gadaleta G, Carone D, Salvatore D, Angione A *et al.* Analysis of cystic fibrosis gene mutations in children with cystic fibrosis and in 964

- infertile couples within the region of Basilicata, Italy: a research study. *J Med Case Rep.* 2014; 10;8:339.
- 22 Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Genetics of male infertility. *Curr Urol Rep.* 2016; 17(10):70.
- 23 Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest.* 1986; 78(5):1245-52.
- 24 Brice P, Jarrett J, Mugford M. Genetic screening for cystic fibrosis: an overview of the science and the economics. *J Cyst Fibros.* 2007; 6(4):255-61.
- 25 Ratjen F. Recent advances in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2008; 9(2):144-8.
- 26 Ministério da Saúde. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. 2016.
- 27 Sociedade de Pediatria de São Paulo - SPSP. Disponível em: http://www.spsp.org.br/2010/03/15/triagem_neonatal_para_fibrose_cistica/ [Acessado em: 29/01/17].
- 28 Sheridan MB, Hefferson TW, Wang N, Merlo C, Milla C, Borowitz D *et al.* CFTR transcription defects in pancreatic sufficient cystic fibrosis patients with only one mutation in the coding region of *CFTR*. *J Med Genet.* 2011; 48:235-41.
- 29 Quinton P, Molyneux L, Ip W, Dupuis A, Avolio J, Tullis E *et al.* β -adrenergic sweat secretion as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186(8):732-9.
- 30 Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V *et al.* Measurements of CFTR-mediated Cl⁻ secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for cystic fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47708.

- 31 Schechter MS, Gutierrez H. Improving the quality of care for patients with cystic fibrosis. *Pediatr.* 2010; 22(3):296-301.
- 32 Dorfman R. Modifier gene studies to identify new therapeutic targets in cystic fibrosis. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(5):674-82.
- 33 Kuehn BM. Progress in treating cystic fibrosis means that many patients may now reach midlife and beyond. *JAMA.* 2014; 312(12):1182-3.
- 34 Shastri SS, Kabra M, Kabra SK, Pandey RM, Menon PS. Characterisation of mutations and genotype–phenotype correlation in cystic fibrosis: Experience from India. *J Cyst Fibros.* 2008; 7(2):110-5.
- 35 Jilling T, Kirk KL. The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int Rev Cytol.* 1997; 172:193-241.
- 36 Bradbury NA, Clark JA, Watkins SC, Widnell CC, Smith HS, Bridges RJ. Characterization of the internalization pathway for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol.* 1999; 276:L659-68.
- 37 Cystic Fibrosis Genetics Analysis Consortium”, 2014 Consortium CFGA. Cystic Fibrosis mutation data base. 1989; Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html> [Acessado em: 29/01/17].
- 38 Elahi E, Khodadad A, Kupersmidt I, Ghasemi F, Alinasab B, Naghizadeh R *et al.* A haplotype framework for cystic fibrosis mutations in Iran. *J Mol Diagn.* 2006; 8(1):119-27.
- 39 Tsui LC, Dorfman R. The Cystic Fibrosis Gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(2):a009472.
- 40 Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000; 67(2):117-33.

- 41 Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P *et al.* Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008; 7(3):179-96.
- 42 Merlo CA, Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med.* 2003; 141(4):237-4.
- 43 Bieger AM; Marson FAL; Bertuzzo CS. Prevalence of $\Delta F508$ mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene among cystic fibrosis patients from a Brazilian referral center. *J Pediatr. (Rio J.).* 2012; 88:531-4.
- 44 Bonadia LC; Marson FAL; Ribeiro JD; Paschoal IA; Pereira MC; Ribeiro AF *et al.* *CFTR* genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene (Amsterdam).* 2014; 540:183-190.
- 45 Marson FAL; Bertuzzo CS; Ribeiro MAG.; Ribeiro AF; Ribeiro JD. Screening for F508del as a first step in the molecular diagnosis of cystic fibrosis. *J Bras Pneumol.* 2013; 39:1-10.
- 46 Zielenski J, Tsui LP. Cystic fibrosis: genotype and phenotype variations. *Annu Rev Gen.* 1995; 29:777-807.
- 47 Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Personalized drug therapy in cystic fibrosis: from fiction to reality. *Curr Drug Targets.* 2015; 16:1007-17.
- 48 Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Classification of *CFTR* mutation classes. *Lancet Respir Med.* 2016; 4(8):37-8.
- 49 Belcher CN, Vij N. Protein processing and inflammatory signaling in cystic fibrosis: challenges and therapeutic strategies. *Curr Mol Med.* 2010; 10:82-94.
- 50 Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet.* 2014; 7:133-46.

- 51 Boyle MP. Strategies for identifying modifier genes in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4(1):52-7.
- 52 Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F *et al.* Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2005; 353(14):1443-53.
- 53 Marson FAL, Bertuzzo CS, Hortencio TDR, Ribeiro JD, Bonadia LC, Ribeiro AF. The *ACE* gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2012; 12:1.
- 54 Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in *ADRB2* gene can modulate the response to bronchodilators and the severity of cystic fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2012; 12:50.
- 55 Lima CSP, Ortega MM, Marson FAL, Zulli R, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. *CFTR* mutations and *GSTM1* and *GSTT1* deletions in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Bras Pneumol.* 2012; 38:50-56.
- 56 Furgeri DT, Marson FAL, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. Association between the IVS4G>T mutation in the *TCF7L2* gene and susceptibility to diabetes in cystic fibrosis patients. *BMC Res Notes.* 2012; 5:561.
- 57 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.
- 58 Marson FAL, Marcelino ARB, Rezende LM, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. The *IFRD1* (57460C>T polymorphism) gene: a negative report in cystic fibrosis clinical severity. *J Mol Genet Med.* 2013; 7:1000058.
- 59 Marson FAL, Marcelino ARB, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. *COX-2* Gene polymorphisms: genetic determinants of cystic fibrosis comorbidities. *Int J Genet.* 2013; 5:132-8.

- 60 Rezende LM, Furgeri DT, Ribeiro AF, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. *ADRA2A* is a cystic fibrosis modifier gene. *Int J Genet*. 2013; 5:125-32.
- 61 Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro AF, Ribeiro JD. Polymorphisms in the glutathione pathway modulate cystic fibrosis severity: a cross-sectional study. *BMC Med Genet*. 2014; 15:27.
- 62 Marson FAL, Zimmerman LA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. *ADIPOR2* polymorphisms in cystic fibrosis are potential modifiers of clinical severity. *J Genet Syndr Gene*. 2014; 05:246.
- 63 Coutinho CAAC, Marson FAL, Marcelino ARB, Bonadia LC, Carlin MP, Ribeiro AF *et al*. *TNF*-alpha polymorphisms as a potential modifier gene in the cystic fibrosis. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2014; 5(2):87-99.
- 64 Furlan LL, Marson FAL, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Salomão Junior JB, Souza DR. *IL8* gene as modifier of cystic fibrosis: unraveling the factors which influence clinical variability. *Hum Genet*. 2016; 135(8):881-94.
- 65 Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennel T *et al*. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536:285-91
- 66 Archer, N, Nassif NT, O'Brien BA. Genetic variants of *SLC11A1* are associated with both autoimmune and infectious diseases: systematic review and meta-analysis. *Genes Immun*. 2015; 16:275-83.
- 67 Just H, Sitte H, Schmid J, Freissmuth M, Kudlacek O. Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *J Biol Chem*. 2004; 279:6650-57.
- 68 Claxton DP, Quick M, Shi L, Carvalho FD, Weinstein H, Javich JA *et al*. Ion/substrate-dependent conformational dynamics of a bacterial homolog of neurotransmitter: sodium symporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; 17:822-9.

- 69 Krishnamurthy H, Gouaux E. X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature*. 2012; 481:469-74.
- 70 Zhu CB, Carneiro AM, Dostmann WR, Hewlett W, Blakely RD. p38 MAPK activation elevates serotonin transport activity via a trafficking-independent, protein phosphatase 2A-dependent process. *J Biol Chem*. 2005; 280:15649-58.
- 71 Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X, Chiang TA *et al*. Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet*. 2012; 44:562-9.
- 72 Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F, Gong J *et al*. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet*. 2014; 133(2):151-61.
- 73 Lohi H, Kujala M, Mäkelä S, Lehtonen E, Kestilä M, Saarialho-Kere U *et al*. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9*. *JBC*. 2002; 277:14246-54.
- 74 Bertrand CA, Zhang R, Pilewski JM, Frizzell RA. SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia. *J Gen Physiol*. 2009; 133(4):421-38.
- 75 Dorwart MR, Shcheynikov N, Wang Y, Stippec S, Muallem S. SLC26A9 is a Cl⁽⁻⁾ channel regulated by the WNK kinases. *J Physiol*. 2007; 584(1):333-45.
- 76 Salomon JJ, Spahn S, Wang X, Füllekrug J, Bertrand CA, Mall MA. Generation and functional characterization of epithelial cells with stable expression of SLC26A9 Cl⁽⁻⁾ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016; 310(7):L593-602.
- 77 Blackman SM, Commander CW, Watson C, Arcara KM, Strug LJ, Stonebraker JR *et al*. Genetic modifiers of cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes*. 2013; 62(10):3627-35.

- 78 Soave D, Miller MR, Keenan K, Li W, Gong J, Ip W *et al.* Evidence for a causal relationship between early exocrine pancreatic disease and cystic fibrosis-related diabetes: a Mendelian randomization study. *Diabetes*. 2014; 63(6):2114-9.
- 79 Sapkota BR, Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Ieki R, Nobuyuki K *et al.* Association of *SLC11A1* (NRAMP1) polymorphisms with pulmonar *Mycobacterium avium* complex infection American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. *Hum Immunol*. 2012; 73(5):529536.
- 80 National Center for Biotechnology Information NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=SLC11A1> [Acessado em: 29/01/17]
- 81 Laubitz D, Harrison CA, Midura-Kiela MT, Ramalingam R, Larmonier CB, Chase JH *et al.* Reduced Epithelial Na⁺/H⁺ Exchange Drives Gut Microbial Dysbiosis and Promotes Inflammatory Response in T Cell-Mediated Murine Colitis. *PLoS One*. 2016; 11(4):0152044.
- 82 TaqMan[®] SNP Genotyping Assays. TaqMan[®] Predesigned SNP Genotyping Assays, TaqMan[®] Custom SNP.
- 83 Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007; 9:289-320.
- 84 Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Vs. www.OpenEpi.com, atualizad in 04/05/2015, accessed in 12/19/2016.
- 85 Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009; 169(4):505-14.
- 86 Gola D, Mahachie John JM, van Steen K, König IR. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. *Brief Bioinform*. 2016; 17:293-308.

- 87 Munk LK, Munk BG. Chloride-dependence of amino acid transport in rabbit ileum. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1027:17-20.
- 88 Anderson CMH, Ganapathy V, Thwaites DT. Human solute carrier SLC6A14 is the β -alanine carrier. *J Physiol*. 2008; 586(17):4061-7.
- 89 Strug L, Gonska T, He G, Keenan K, Ip W, Bo P *et al*. Cystic fibrosis gene modifier SLC26A9 modulates airway response to CFTR-directed therapeutics. *Hum Mol Genet*. 2016; 25 (20): 4590-4600.
- 90 Miller MR, Soave D, Li W, Gong J, Pace RG, Boëlle PY *et al*. Variants in solute carrier *SLC26A9* modify prenatal exocrine pancreatic damage in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2015; 166(5):1152-7.
- 91 Wyllie S, Seu P, Gross JA. The natural resistance-associated macrophage protein 1 SLC11A1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. *Microbes Infect*. 2002; 4(3):351-9.
- 92 Chang MH, Plata C, Zandi-Nejad K, Sindic A, Sussman CR, Mercado A *et al*. Slc26a9—anion exchanger, channel and Na⁺ transporter. *J Membrane Biol*. 2009; 228:125-40.
- 93 Reid DW, Anderson GJ, Lamont IL. Role of lung iron in determining the bacterial and host struggle in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 297:795-802.
- 94 Dorfman R, Taylor C, Lin F, Sun L, Sandford A, Paré P *et al*. Modulatory effect of the *SLC9A3* gene on susceptibility to infections and pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2011; 46:385-92.

APÊNDICES

Apêndice 1. Valores de p para a variante rs3788766 (agrupamento: CC, CT e TT) no gene *SLC6A14* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	<0,001[#]	0,001	<0,001[#]	0,001	0,023[#]	0,023	<0,001[#]	0,001
Raça	0,276 [#]		0,37 [#]		0,261 [#]		0,611 [#]	
Idade	0,365 [¥]		0,537 [#]		0,667 [#]		0,184 [¥]	
Início dos sintomas	0,922 [¥]		0,510 [#]		0,704 [#]		0,998 [¥]	
Diagnóstico	0,224 [¥]		0,738 [#]		0,984 [#]		0,193 [¥]	
Início dos sintomas digestivos	0,939 [¥]		0,404 [#]		0,981 [#]		0,840 [¥]	
Início dos sintomas pulmonares	0,036[#]	0,144	0,724 [#]	0,724	0,537 [#]	0,716	0,523 [¥]	0,716
Índice de massa corpórea	0,008[#]	0,014	0,482 [#]	0,482	0,346 [#]	0,461	0,01[#]	0,02
Polipose nasal	0,819 [#]		0,205 [#]		0,459 [#]		0,392 [#]	
Diabetes mellitus	0,289 [#]		0,821 [#]		0,345 [#]		0,551 [#]	
Osteoporose	0,201 [#]	0,268	0,659 [#]	0,659	0,107 [#]	0,214	0,039[#]	0,156
Insuficiência pancreática	0,777 [#]	0,779	0,779 [#]	0,779	0,034[#]	0,136	0,336 [#]	0,672
Íleo meconial	0,309 [#]		0,641 [#]		0,709 [#]		0,746 [#]	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,548 [#]		0,201 [#]		0,680 [#]		0,645 [#]	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,006[#]	0,024	0,777 [#]	0,777	0,489 [#]	0,652	0,129 [¥]	0,258
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,64 [¥]		0,476 [#]		0,536 [#]		0,192 [¥]	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,08 [#]		0,363 [#]		-		0,207 [#]	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,710 [#]		0,722 [#]		0,373 [#]		0,78 [¥]	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,020[#]	0,07	0,035[#]	0,07	0,71 [#]	0,71	0,06 [#]	0,08
SA+PA	0,234 [#]		0,107 [#]		0,727 [#]		0,512 [#]	
Bactéria	0,194 [#]		0,468 [#]		0,218 [#]		0,686 [#]	
SaO ₂	0,712		0,931		0,338		0,917	
Bhalla	0,141	0,281	0,211	0,281	0,299	0,299	0,047	0,188
Kanga	0,769		0,329		0,615		0,965	
Shwachman-Kulczycki	0,873		0,106		0,896		0,360	
CVF	0,574		0,433		0,668		0,242	
VEF ₁	0,493		0,363		0,388		0,295	
VEF ₁ /CVF	0,819		0,463		0,161		0,664	
FEF _{25%}	0,315		0,376		0,254		0,071	
FEF _{50%}	0,352		0,171		0,563		0,194	
FEF _{75%}	0,574		0,307		0,689		0,41	
FEF _{25-75%}	0,787		0,442		0,457		0,726	
FEF _{max}	0,27	0,36	0,533	0,533	0,104	0,208	0,041	0,164
VRE	0,184		0,448		0,521		0,186	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,838		0,498		0,995		0,989	
VEF ₁	0,411		0,231		0,598		0,203	
VEF ₁ /CVF	0,242		0,186		0,977		0,132	
FEF _{25%}	0,675		0,562		0,607		0,704	
FEF _{50%}	0,583		0,112		0,795		0,237	
FEF _{75%}	0,564		0,84		0,944		0,586	
FEF _{25-75%}	0,563		0,512		0,962		0,391	
FEF _{max}	0,806		0,073		0,569		0,821	
VRE	0,949		0,533		0,105		0,747	

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a Classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 de Pearson[¥] e teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e dos dados numéricos pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 2. Valores de p para a variante rs3788766 (agrupamento: CC versus CT+TT) do gene *SLC6A14* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,055*	0,11	0,2*	0,267	0,383*	0,383	0,005*	0,02
Raça	0,143*		1*		1*		0,485*	
Idade	1*		0,331*		0,569*		0,251*	
Início dos sintomas	0,784*		0,697*		1*		1*	
Diagnóstico	0,786*		0,499*		1*		0,553*	
Início dos sintomas digestivos	0,781*		1*		1*		0,836*	
Início dos sintomas pulmonares	0,156*		0,717*		0,560*		0,676*	
Índice de massa corpórea	0,109*		0,418*		1*		0,07*	
Polipose nasal	1*		0,309*		1*		0,414*	
Diabetes mellitus	0,757*		1*		0,382*		0,622*	
Osteoporose	0,204*		1*		1*		0,603*	
Insuficiência pancreática	1*		1*		0,098*		0,203*	
Íleo meconial	0,444*		1*		1*		0,767*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,344*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,006*	0,024	0,737*	0,737	0,253*	0,337	0,074*	0,148
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,043*	0,172	0,733*	0,977	1*	1	0,106*	0,212
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,704*		1*		-		0,519*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,731*		0,659*		0,27*		0,789*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,063*	0,126	0,166*	0,221	0,574*	0,574	0,044*	0,126
SA+PA	0,177 [#]		0,186 [#]		0,94 [#]		0,203 [#]	
Bactéria	0,409 [#]		0,339 [#]		0,41 [#]		0,754 [#]	
SaO ₂	0,41		1		0,753		0,772	
Bhalla	0,695		0,914		0,308		0,358	
Kanga	0,499		0,199		0,643		0,921	
Shwachman-Kulczycki	0,976		0,107		1		0,539	
CVF	0,292		0,655		0,408		0,135	
VEF ₁	0,265		0,76		0,216		0,121	
VEF ₁ /CVF	0,978		0,308		0,060		0,595	
FEF _{25%}	0,143		0,86		0,124		0,064	
FEF _{50%}	0,151		0,98		0,411		0,124	
FEF _{75%}	0,328		0,908		0,555		0,286	
FEF _{25-75%}	0,491		0,832		0,347		0,434	
FEF _{max}	0,106	0,141	0,485	0,485	0,036	0,072	0,012	0,048
VRE	0,731		0,447		0,63		0,994	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,553		0,448		1		0,932	
VEF ₁	0,508		0,105		0,509		0,091	
VEF ₁ /CVF	0,114	0,152	0,114	0,152	1	1	0,044	0,152
FEF _{25%}	0,481		0,344		0,429		0,592	
FEF _{50%}	0,575	0,767	0,033	0,132	0,857	0,857	0,106	0,212
FEF _{75%}	0,373		0,694		1		0,374	
FEF _{25-75%}	0,662		0,268		0,953		0,265	
FEF _{max}	0,517		0,129		0,429		0,957	
VRE	0,769		0,367		0,071		0,448	

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 3. Valores de p para a variante rs3788766 (agrupamento: TT versus CT+CC) do gene *SLC6A14* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MIMNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,009*	0,014	0,011*	0,015	0,472*	0,472	<0,001*	0,004
Raça	0,242*		0,587*		0,534*		1*	
Idade	0,268*		0,773*		0,642*		0,81*	
Início dos sintomas	1*		1*		1*		1*	
Diagnóstico	0,278*		0,758*		1*		0,412*	
Início dos sintomas digestivos	1*		0,335*		1*		0,605*	
Início dos sintomas pulmonares	0,373*		1*		1*		0,615*	
Índice de massa corpórea	0,008*	0,016	0,442*	0,589	0,633*	0,633	0,004*	0,016
Polipose nasal	0,776*		0,654*		1*		1*	
Diabetes mellitus	0,448*		0,654*		0,188*		0,682*	
Osteoporose	1*		0,690*		0,194*		0,203*	
Insuficiência pancreática	0,662*		0,706*		0,678*		0,673*	
Íleo meconial	1*		0,694*		1*		1*	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,807*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,15*		0,562*		0,371*		0,108*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,167*		0,362*		0,678*		0,252*	
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	0,058*		0,593*		-		0,105*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,578*		0,69*		0,497*		0,517*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,777*	1	0,04*	0,16	1*	1	0,157*	0,314
SA+PA	0,123 [#]		0,019 [#]		0,471 [#]		0,424 [#]	
Bactéria	0,122 [#]		0,154 [#]		0,286 [#]		0,648 [#]	
SaO ₂	0,673		0,762		0,238		0,981	
Bhalla	0,072	0,144	0,151	0,201	0,94	0,94	0,017	0,068
Kanga	0,567		0,205		0,643		0,88	
Shwachman-Kulczycki	0,648		0,96		0,727		0,48	
CVF	0,565		0,21		0,487		0,139	
VEF ₁	0,773		0,171		0,637		0,305	
VEF ₁ /CVF	0,612		0,926		0,276		0,366	
FEF _{25%}	0,254	0,254	0,193	0,254	0,152	0,254	0,031	0,124
FEF _{50%}	0,354		0,093		0,765		0,1	
FEF _{75%}	0,383		0,201		0,898		0,21	
FEF _{25-75%}	0,738		0,323		1		0,568	
FEF _{max}	0,397		0,3		0,202		0,093	
VRE	0,201		0,22		0,329		0,125	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,75		0,264		1		0,956	
VEF ₁	0,184		0,247		1		0,16	
VEF ₁ /CVF	0,167		1		1		0,306	
FEF _{25%}	0,4		0,427		0,686		0,407	
FEF _{50%}	0,299		0,399		1		0,197	
FEF _{75%}			0,581		1		0,36	
FEF _{25-75%}	0,32		0,52		0,808		0,203	
FEF _{max}	0,778	0,778	0,028	0,112	0,343	0,686	0,615	0,778
VRE	0,958		0,371		0,686		0,748	

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 4. Valores de p para a variante rs3788766 (agrupamento: CT versus CC+TT) do gene *SLC6A14* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	<0,001*	0,001	<0,001*	0,001	0,046*	0,046	<0,001*	0,001
Raça	1*		0,553*		1*		0,737*	
Idade	0,222*		0,745*		1*		0,361*	
Início dos sintomas	1*		0,453*		0,57*		1*	
Diagnóstico	0,133*		1*		1*		0,9*	
Início dos sintomas digestivos	1*		0,257*		1*		0,691*	
Início dos sintomas pulmonares	0,022*	0,088	0,731*	0,731	0,604*	0,731	0,337*	0,674
Índice de massa corpórea	0,273*		1*		0,557*		0,137*	
Polipose nasal	0,532*		0,607*		0,481*		0,311*	
Diabetes mellitus	0,163*		1*		0,382*		0,349*	
Osteoporose	0,275*	0,367	0,655*	0,655	0,265*	0,367	0,026*	0,104
Insuficiência pancreática	0,605*		0,666*		0,596*		0,624*	
Íleo meconial	0,287*		0,654*		1*		0,584*	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,79*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,808*		1*		1*		1*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,799*		0,5*		0,596*		0,85*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,073*		0,55*		-		0,204*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,754*		1*		1*		0,801*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,182*		0,655*		1*		0,815*	
SA+PA	0,499 [#]		0,356 [#]		0,382 [#]		0,898 [#]	
Bactéria	0,175 [#]		0,737 [#]		0,139 [#]		0,375 [#]	
SaO ₂	0,781		0,72		0,211		0,753	
Bhalla	0,91		0,12		0,231		0,058	
Kanga	0,983		0,901		-		0,79	
Shwachman-Kulczycki	0,63		0,072		0,833		0,156	
CVF	0,726		0,325		0,971		0,768	
VEF ₁	0,459		0,235		0,496		0,779	
VEF ₁ /CVF	0,543		0,345		0,592		0,59	
FEF _{25%}	0,934		0,231		1		0,461	
FEF _{50%}	0,765		0,082		0,491		0,66	
FEF _{75%}	0,948		0,146		0,549		0,666	
FEF _{25-75%}	0,781		0,219		0,347		0,942	
FEF _{max}	0,564		0,639		0,606		0,671	
VRE	0,068		0,527		0,436		0,082	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,837		0,574		0,953		0,888	
VEF ₁	0,379		0,884		0,432		0,978	
VEF ₁ /CVF	0,959		0,195		0,921		0,493	
FEF _{25%}	0,78		0,941		1		0,673	
FEF _{50%}	0,519		0,443		0,643		0,95	
FEF _{75%}	0,787		0,824		1		0,848	
FEF _{25-75%}	0,437		0,787		0,859		0,685	
FEF _{max}	0,758		0,334		0,857		0,544	
VRE	0,821		0,907		0,286		0,725	

SLC6A14, Solute carrier family 6 member 14; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 5. Valores de p para a variante rs7512462 (agrupamento: CC, CT e TT) do gene *SLC26A9* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,128 [¥]		0,825 [¥]		0,811 [#]		0,239 [¥]	
Raça	0,75 [#]		0,868 [#]		0,542 [#]		0,771 [#]	
Idade	0,259 [¥]	0,259	0,153 [#]	0,204	0,056 [#]	0,112	0,026[¥]	0,104
Início dos sintomas	0,743 [¥]		0,837 [#]		0,887 [#]		0,531 [¥]	
Diagnóstico	0,732 [¥]		0,541 [#]		0,089 [#]		0,892 [¥]	
Início dos sintomas digestivos	0,609 [¥]		0,653 [#]		0,21 [#]		0,343 [¥]	
Início dos sintomas pulmonares	0,366 [¥]		0,708 [#]		0,898 [#]		0,778 [¥]	
Índice de massa corpórea	0,225 [#]		0,058 [#]		0,238 [#]		0,348 [#]	
Polipose nasal	0,351 [#]		0,205 [#]		0,347 [#]		0,109 [#]	
Diabetes mellitus	0,108 [#]		0,746 [#]		0,199 [#]		0,164 [#]	
Osteoporose	0,741 [#]		0,05 [#]		0,465 [#]		0,733 [#]	
Insuficiência pancreática	0,565 [#]		0,478 [#]		0,264 [#]		0,224 [#]	
Íleo meconial	0,125 [#]		0,214 [#]		0,163 [#]		0,917 [#]	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,288 [¥]		0,911 [#]		0,421 [¥]		0,585 [#]	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,551 [¥]		0,192 [#]		0,196 [#]		0,355 [#]	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,68 [¥]		0,375 [¥]		0,878 [#]		0,946 [¥]	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,347 [#]		0,886 [#]		-		0,315 [#]	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,378 [#]		0,074 [#]		0,034 [#]		0,273 [¥]	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,902 [#]		0,659 [#]		0,536 [#]		0,995 [¥]	
SA+PA	0,734 [#]		0,245 [#]		0,815 [#]		0,993 [#]	
Bactéria	0,382 [#]		0,95 [#]		0,638 [#]		0,607 [#]	
SaO ₂	0,734		0,991		0,149		0,381	
Bhalla	0,759		0,58		0,857		0,374	
Kanga	0,707		0,489		1		0,34	
Shwachman-Kulczycki	0,516		0,061		0,959		0,377	
CVF	0,417		0,106		0,846		0,061	
VEF ₁	0,36	0,48	0,193	0,386	0,718	0,718	0,047	0,188
VEF ₁ /CVF	0,229	0,229	0,207	0,229	0,2	0,229	0,022	0,088
FEF _{25%}	0,202		0,531		0,225		0,076	
FEF _{50%}	0,153	0,306	0,428	0,428	0,321	0,428	0,038	0,152
FEF _{75%}	0,106		0,518		0,326		0,051	
FEF _{25-75%}	0,211	0,347	0,26	0,347	0,352	0,352	0,016	0,064
FEF _{max}	0,466		0,969		0,562		0,469	
VRE	0,313		0,318		0,713		0,066	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,962		0,072		0,717		0,744	
VEF ₁	0,905	0,905	0,011	0,044	0,505	0,673	0,489	0,673
VEF ₁ /CVF	0,586		0,21		0,2		0,805	
FEF _{25%}	0,39		0,18		0,13		0,744	
FEF _{50%}	0,759		0,063		0,353		0,732	
FEF _{75%}	0,613		0,115		0,509		0,624	
FEF _{25-75%}	0,799	0,799	0,008	0,032	0,434	0,579	0,368	0,579
FEF _{max}	0,651		0,81		0,39		0,953	
VRE	0,164		0,92		0,211		0,123	

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 de Pearson[¥] e teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e dos dados numéricos pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 6. Valores de p para a variante rs7512462 (agrupamento: CC versus CT+TT) do gene *SLC26A9* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,049*	0,196	1*	1	1*	1	0,1*	0,2
Raça	0,673*		1*		0,41*		1*	
Idade	1*		0,103*		0,296*		0,707*	
Início dos sintomas	1*		0,722*		1*		0,847*	
Diagnóstico	0,607*		0,725*		0,555*		0,703*	
Início dos sintomas digestivos	0,607*		1*		0,263*		0,32*	
Início dos sintomas pulmonares	1*		0,516*		1*		1*	
Índice de massa corpórea	1*		0,174*		0,254*		0,446*	
Polipose nasal	0,299*		0,097*		1*		0,061*	
Diabetes mellitus	0,77*		0,59*		1*		1*	
Osteoporose	0,692*		0,166*		0,315*		1*	
Insuficiência pancreática	0,591*		0,403*		0,326*		0,215*	
Íleo meconial	0,721*		1*		0,179*		1*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,390*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,455*		0,737*		0,29*		0,253*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,604*		0,306*		1*		0,847*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,154*		1*		-		0,122*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,201*		0,35*		1*		0,126*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,736*		1*		1*		1*	
SA+PA	0,848 [#]		0,362 [#]		0,89 [#]		0,929 [#]	
Bactéria	0,5 [#]		0,247 [#]		0,25 [#]		0,282 [#]	
SaO ₂	0,599		0,927		0,058		0,174	
Bhalla	0,473		0,342		0,692		0,237	
Kanga	0,423		0,259		1		0,143	
Shwachman-Kulczycki	0,739	0,864	0,019	0,076	0,864	0,864	0,227	0,454
CVF	0,244	0,325	0,078	0,156	0,575	0,575	0,043	0,156
VEF ₁	0,193	0,257	0,16	0,257	0,488	0,488	0,03	0,12
VEF ₁ /CVF	0,107	0,107	0,078	0,107	0,097	0,107	0,009	0,036
FEF _{25%}	0,174		0,335		0,736		0,19	
FEF _{50%}	0,074	0,148	0,266	0,355	0,961	0,961	0,042	0,148
FEF _{75%}	0,071		0,272		1		0,61	
FEF _{25-75%}	0,112	0,165	0,124	0,165	0,183	0,183	0,011	0,044
FEF _{Max}	0,338		0,935		1		0,468	
VRE	0,273		0,464		0,582		0,118	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,808	0,808	0,023	0,092	0,549	0,732	0,47	0,732
VEF ₁	0,767		0,11		0,296		0,319	
VEF ₁ /CVF	0,818		1		0,218		0,687	
FEF _{25%}	0,926		0,725		0,25		0,607	
FEF _{50%}	0,852		0,646		0,5		0,808	
FEF _{75%}	0,323		0,4		1		0,825	
FEF _{25-75%}	0,510		0,317		0,245		0,507	
FEF _{Max}	0,694		0,179		0,75		0,761	
VRE	0,126		0,721		0,75		0,109	

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo False Rate Discovery test.

Apêndice 7. Valores de p para a variante rs7512462 (agrupamento: TT versus CT+CC) do gene *SLC26A9* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,363*		0,748*		0,678*		0,499*	
Raça	0,691*		1*		0,536*		0,534*	
Idade	0,161*	0,215	1*	1	0,075*	0,15	0,036*	0,144
Início dos sintomas	0,64*		0,713*		1*		0,278*	
Diagnóstico	1*		0,325*		0,101*		0,860*	
Início dos sintomas digestivos	0,813*		0,718*		1*		0,711*	
Início dos sintomas pulmonares	0,232*		0,731*		1*		0,586*	
Índice de massa corpórea	0,313*		1*		0,571*		0,636*	
Polipose nasal	0,358*		1*		0,549*		0,15*	
Diabetes mellitus	0,111*		1*		1*		0,118*	
Osteoporose	0,74*		0,08*		1*		0,494*	
Insuficiência pancreática	1*		0,413*		0,648*		0,171*	
Íleo meconial	0,198*		0,087*		1*		1*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,192*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,818*		0,099*		0,622*		0,295*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,472*		0,321*		1*		1*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,525*		1*		-		1*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,395*	0,488	0,166*	0,332	0,04*	0,16	0,488*	0,488
<i>Staphylococcus aureus</i>	1*		0,655*		0,352*		1*	
SA+PA	0,707 [#]		0,257 [#]		0,565 [#]		0,977 [#]	
Bactéria	0,243 [#]		0,396 [#]		0,963 [#]		0,715 [#]	
SaO ₂	0,452		0,97		0,447		0,45	
Bhalla	0,634		0,914		0,923		0,778	
Kanga	0,608		0,533		-		0,523	
Shwachman-Kulczycki	0,253		0,692		1		0,275	
CVF	0,866		0,654		0,969		0,602	
VEF ₁	0,933		0,593		0,844		0,666	
VEF ₁ /CVF	0,984		0,48		0,105		0,931	
FEF _{25%}	0,545		0,909		0,187		0,179	
FEF _{50%}	0,945		0,872		0,198		0,409	
FEF _{75%}	0,697		0,901		0,935		0,411	
FEF _{25-75%}	0,886		0,949		0,364		0,628	
FEF _{max}	0,702		0,856		0,727		0,496	
VRE	0,548		0,36		0,824		0,272	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,96		0,295		0,824		0,64	
VEF ₁	0,682	0,824	0,02	0,08	0,824	0,824	0,352	0,704
VEF ₁ /CVF	0,304		0,098		0,582		0,716	
FEF _{25%}	0,186		0,072		0,5		0,706	
FEF _{50%}	0,46	0,5	0,019	0,076	0,5	0,5	0,429	0,5
FEF _{75%}	0,734	0,734	0,036	0,144	0,5	0,667	0,409	0,667
FEF _{25-75%}	0,739	0,941	0,001	0,004	0,941	0,941	0,164	0,328
FEF _{max}	0,506		0,263		0,5		0,876	
VRE	0,115		1		0,25		0,085	

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 8. Valores de p para a variante rs7512462 (agrupamento: CT versus CC+TT) do gene *SLC26A9* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,506*		0,578*		0,720*		0,639*	
Raça	1*		1*		0,552*		0,773*	
Idade	0,255*	0,34	0,148*	0,296	1*	1	0,025*	0,1
Início dos sintomas	0,501*		1*		1*		0,613*	
Diagnóstico	0,650*		0,758*		1*		0,869*	
Início dos sintomas digestivos	0,363*		0,5*		0,35*		0,159*	
Início dos sintomas pulmonares	0,356*		1*		0,669*		0,736*	
Índice de massa corpórea	0,108*		0,130*		0,184*		0,190*	
Polipose nasal	1*		0,352*		0,613*		1*	
Diabetes mellitus	0,066*		1*		0,238*		0,094*	
Osteoporose	0,516*		1*		0,698*		0,673*	
Insuficiência pancreática	0,643*		1*		1*		0,833*	
Íleo meconial	0,058*		0,418*		0,429*		0,811*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,63*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,369*		0,373*		0,662*		0,872*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,817*		1*		0,704*		0,743*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,754*		1*		-		0,418*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	1*		0,69*		0,175*		0,663*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,773*		0,69*		1*		1*	
SA+PA	0,446 [#]		0,168 [#]		0,444 [#]		0,871 [#]	
Bactéria	0,323 [#]		0,479 [#]		0,741 [#]		0,628 [#]	
SaO ₂	0,785		0,899		0,262		0,526	
Bhalla	0,847		0,539		0,234		0,127	
Kanga	0,827		0,631		0,786		0,644	
Shwachman-Kulczycki	0,426		0,125		0,294		0,874	
CVF	0,249	0,498	0,51	0,68	0,760	0,76	0,034	0,136
VEF ₁	0,232	0,309	0,86	0,860	0,229	0,309	0,016	0,064
VEF ₁ /CVF	0,172	0,229	0,381	0,381	0,023	0,046	0,01	0,04
FEF _{25%}	0,088	0,176	0,345	0,345	0,142	0,189	0,012	0,048
FEF _{50%}	0,112	0,149	0,267	0,267	0,1	0,149	0,007	0,028
FEF _{75%}	0,057	0,079	0,413	0,413	0,059	0,079	0,008	0,032
FEF _{25-75%}	0,135	0,18	0,196	0,196	0,084	0,168	0,005	0,02
FEF _{max}	0,242		0,829		0,343		0,175	
VRE	0,138	0,185	0,139	0,185	0,527	0,527	0,023	0,092
Pós Broncodilatador								
CVF	0,806		0,281		0,887		0,718	
VEF ₁	0,906		0,318		0,193		0,919	
VEF ₁ /CVF	0,469		0,172		0,126		0,548	
FEF _{25%}	0,269		0,202		0,071		0,426	
FEF _{50%}	0,613		0,116		0,786		0,687	
FEF _{75%}	0,602		0,302		1		0,424	
FEF _{25-75%}	0,802		0,093		0,161		0,574	
FEF _{max}	0,259	0,345	0,025	0,1	0,25	0,345	0,871	0,871
VRE	0,895	0,895	0,733	0,895	0,036	0,144	0,799	0,895

SLC26A9, Solute carrier family 26 member 9; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 9. Valores de p para a variante rs17235416 (presença/ ausência) do gene *SLC11A1* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*)(Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	M/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,442*	0,589	0,610*	0,61	0,006*	0,024	0,201*	0,402
Raça	1*		1*		0,476*		1*	
Idade	1*		0,593*		0,131*		1*	
Início dos sintomas	0,432*		0,528*		1*		0,397*	
Diagnóstico	0,439*		1*		0,204*		0,383*	
Início dos sintomas digestivos	0,709*		1*		0,603*		0,768*	
Início dos sintomas pulmonares	0,24*		1*		0,618*		0,159*	
Índice de massa corpórea	0,586*		1*		1*		0,313*	
Polipose nasal	0,605*		1*		1*		0,703*	
Diabetes mellitus	1*		1*		1*		0,474*	
Osteoporose	1*		1*		0,626*		1*	
Insuficiência pancreática	0,360*		1*		1*		0,721*	
Íleo meconial	0,586*		1*		1*		0,22*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,648*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,25*		1*		0,574*		0,412*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	1*		0,544*		0,326*		0,785*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1*		1*		-		1*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	1*		1*		0,331*		1*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,013*	0,052	1*	1	1*	1	0,039*	0,078
SA+PA	0,09 [#]		0,642 [#]		0,318 [#]		0,21 [#]	
Bactéria	0,663 [#]		0,646 [#]		0,482 [#]		0,784 [#]	
SaO ₂	0,056	0,075	0,050	0,075	0,447	0,447	0,010	0,04
Bhalla	0,924		-		0,154		0,535	
Kanga	0,593		0,143		0,250		0,722	
Shwachman-Kulczycki	0,681		-		0,485		0,815	
CVF	0,276		0,290		0,353		0,912	
VEF ₁	0,233		0,734		0,398		0,939	
VEF ₁ /CVF	0,524		0,532		0,353		0,872	
FEF _{25%}	0,519		0,901		1		0,520	
FEF _{50%}	0,303		0,966		1		0,430	
FEF _{75%}	0,326		1		1		0,364	
FEF _{25-75%}	0,174		0,907		0,401		0,604	
FEF _{max}	0,371		0,513		0,333		0,955	
VRE	0,520		0,593		0,909		0,931	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,929		0,430		0,368		0,720	
VEF ₁	0,285		0,619		0,824		0,526	
VEF ₁ /CVF	0,678		0,966		0,727		0,730	
FEF _{25%}	0,802		0,239		0,250		0,760	
FEF _{50%}	0,802		0,627		0,250		0,611	
FEF _{75%}	0,403		0,570		0,250		0,448	
FEF _{25-75%}	0,449		0,568		0,721		0,637	
FEF _{max}	0,550		0,689		0,250		0,830	
VRE	0,571		0,083		1		0,136	

SLC11A1, Solute carrier family 11 member 1; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 10. Valores de p para a variante rs17563161 (agrupamento: AA, GA e GG) do gene *SLC9A3* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,031[#]	0,124	0,399 [#]	0,399	0,333 [#]	0,399	0,135 [#]	0,027
Raça	0,728 [#]		0,23 [#]		0,836 [#]		0,63 [#]	
Idade	0,735 [#]		0,485 [#]		0,343 [#]		0,486 [#]	
Início dos sintomas	0,282 [#]		0,401 [#]		0,818 [#]		0,241 [#]	
Diagnóstico	0,487 [#]		0,410 [#]		0,823 [#]		0,447 [#]	
Início dos sintomas digestivos	0,051 [#]	0,102	0,213 [#]	0,284	0,347 [#]	0,347	0,024[#]	0,096
Início dos sintomas pulmonares	0,678 [#]		1 [#]		0,333 [#]		0,383 [#]	
Índice de massa corpórea	0,529*	0,705	0,829 [#]	0,829	0,155*	0,620	0,333 [#]	0,666
Polipose nasal	0,6 [#]		0,666 [#]		0,422 [#]		0,786 [#]	
Diabetes mellitus	0,66 [#]		0,09 [#]		0,193 [#]		0,816 [#]	
Osteoporose	0,404 [#]		0,757 [#]		0,510 [#]		0,460 [#]	
Insuficiência pancreática	0,806 [#]		0,246 [#]		0,221 [#]		0,825 [#]	
Íleo meconial	0,319 [#]		0,813		0,373 [#]		0,484 [#]	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,606 [#]		0,537 [#]		0,172 [#]		0,642 [#]	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,541 [#]		0,574 [#]		0,814 [#]		0,496 [#]	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,237 [#]		0,499 [#]		0,686 [#]		0,587 [#]	
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	0,599 [#]		0,934 [#]		-		0,809 [#]	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,082 [#]		0,357 [#]		0,587 [#]		0,765 [#]	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,583 [#]		0,757 [#]		0,43 [#]		0,693 [#]	
SA+PA	0,510 [#]		0,827 [#]		0,117 [#]		0,525 [#]	
Bactéria	0,645 [#]		0,738 [#]		0,806 [#]		0,864 [#]	
SaO ₂	0,451		0,228		0,833		0,787	
Bhalla	0,313		0,972		0,943		0,391	
Kanga	0,646		0,865		0,643		0,584	
Shwachman-Kulczycki	0,494		0,518		0,461		0,482	
CVF	0,227		0,3		0,297		0,066	
VEF ₁	0,329		0,393		0,141		0,073	
VEF ₁ /CVF	0,816		0,699		0,064		0,7	
FEF _{25%}	0,98		0,741		0,391		0,969	
FEF _{50%}	0,722		0,809		0,156		0,503	
FEF _{75%}	0,906		0,457		0,539		0,549	
FEF _{25-75%}	0,767		0,555		0,114		0,215	
FEF _{max}	0,457		0,352		0,461		0,201	
VRE	0,799		0,651		0,376		0,764	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,562		0,337		0,646		0,598	
VEF ₁	0,506		0,57		0,234		0,654	
VEF ₁ /CVF	0,624		0,831		0,527		0,532	
FEF _{25%}	0,823		0,367		0,393		0,746	
FEF _{50%}	0,162		0,396		1		0,555	
FEF _{75%}	0,074		0,52		1		0,104	
FEF _{25-75%}	0,418		0,36		0,799		0,97	
FEF _{max}	0,683		0,837		1		0,866	
VRE	0,806		0,104		0,25		0,636	

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e dos dados numéricos pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 11. Valores de p para a variante rs17563161 (agrupamento: GG versus GA+AA) do gene *SLC9A3* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,044*	0,176	0,772*	0,772	0,444*	0,592	0,105*	0,21
Raça	1*		0,282*		1*		0,546*	
Idade	0,821*		0,762		0,635*		1*	
Início dos sintomas	0,363*		0,314*		1*		0,171*	
Diagnóstico	0,506*		0,533*		1*		1*	
Início dos sintomas digestivos	0,066*	0,132	0,176*	0,235	0,603*	0,603	0,012*	0,048
Início dos sintomas pulmonares	0,819*		0,750*		0,405*		0,731*	
Índice de massa corpórea	0,539*		1*		0,155*		0,19*	
Polipose nasal	0,765*		0,640*		0,574*		0,816*	
Diabetes mellitus	0,792*		0,143*		0,234*		1*	
Osteoporose	0,499*		0,692*		0,677*		0,381*	
Insuficiência pancreática	1*		0,228*		0,42*		1*	
Íleo meconial	0,529*		1*		1*		0,331*	
1 ^a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,63*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,652*		1*		1*		0,738*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,343*		0,753*		1*		0,735*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,745*		1*		-		0,777*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,154*		0,235*		1*		0,822*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,752*		0,692*		0,670*		0,672*	
SA+PA	0,518 [#]		0,558 [#]		0,117 [#]		0,211 [#]	
Bactéria	0,645 [#]		0,512 [#]		0,806 [#]		0,726 [#]	
SaO ₂	0,451		0,086		0,833		0,493	
Bhalla	0,313		1		0,943		0,391	
Kanga	0,646		0,869		0,643		0,584	
Shwachman-Kulczycki	0,494		0,531		0,461		0,482	
CVF	0,227		0,305		0,297		0,066	
VEF ₁	0,329		0,411		0,141		0,073	
VEF ₁ /CVF	0,816		0,704		0,064		0,7	
FEF _{25%}	0,980		0,746		0,391		0,969	
FEF _{50%}	0,722		0,812		0,156		0,503	
FEF _{75%}	0,906		0,464		0,539		0,549	
FEF _{25-75%}	0,767		0,562		0,114		0,215	
FEF _{max}	0,457		0,359		0,461		0,201	
VRE	0,799		0,675		0,376		0,764	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,562		0,356		0,646		0,598	
VEF ₁	0,506		0,593		0,234		0,654	
VEF ₁ /CVF	0,624		0,835		0,527		0,532	
FEF _{25%}	0,823		0,375		0,393		0,746	
FEF _{50%}	0,162		0,403		1		0,555	
FEF _{75%}	0,074		0,527		1		0,104	
FEF _{25-75%}	0,418		0,379		0,799		0,97	
FEF _{max}	0,683		0,89		1		0,866	
VRE	0,806		0,106		0,25		0,636	

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 12. Valores de p para a variante rs17563161 (agrupamento: AA versus GA+GG) do gene *SLC9A3* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	-		0,479*		-		1*	
Raça	-		1*		-		1*	
Idade	-		1*		-		0,494*	
Início dos sintomas	-		1*		-		1*	
Diagnóstico	-		0,463*		-		0,451*	
Início dos sintomas digestivos	-		1*		-		1*	
Início dos sintomas pulmonares	-		0,419*		-		0,446*	
Índice de massa corpórea	-		1*		-		1*	
Polipose nasal	-		1*		-		1*	
Diabetes mellitus	-		1*		-		1*	
Osteoporose	-		1*		-		1*	
Insuficiência pancreática	-		1*		-		1*	
Íleo meconial	-		1*		-		1*	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	-		1*		-		1*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	-		1*		-		1*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-		1*		-		1*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	-		1*		-		1*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-		1*		-		1*	
SA+PA	-		0,85 [#]		-		0,806 [#]	
Bactéria	-		0,78 [#]		-		0,738 [#]	
SaO ₂	-		0,844		-		0,904	
Bhalla	-		-		-		-	
Kanga	-		-		-		-	
Shwachman-Kulczycki	-		-		-		-	
CVF	-		-		-		-	
VEF ₁	-		-		-		-	
VEF ₁ /CVF	-		-		-		-	
FEF _{25%}	-		-		-		-	
FEF _{50%}	-		-		-		-	
FEF _{75%}	-		-		-		-	
FEF _{25-75%}	-		-		-		-	
FEF _{max}	-		-		-		-	
VRE	-		-		-		-	
Pós Broncodilatador	-		-		-		-	
CVF	-		-		-		-	
VEF ₁	-		-		-		-	
VEF ₁ /CVF	-		-		-		-	
FEF _{25%}	-		-		-		-	
FEF _{50%}	-		-		-		-	
FEF _{75%}	-		-		-		-	
FEF _{25-75%}	-		-		-		-	
FEF _{max}	-		-		-		-	
VRE	-		-		-		-	

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 13. Valores de p para a variante rs17563161 (agrupamento: GA versus GG+AA) do gene *SLC9A3* considerando o genótipo das mutações identificadas no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Classe I a III).

Variável	MI/MI	P ^c	MI/MNI	P ^c	MNI/MNI	P ^c	Total	P ^c
Sexo	0,044*	0,176	0,556*	0,556	0,444*	0,556	0,143*	0,286
Raça	1*		0,543*		1*		0,547*	
Idade	0,821*		1*		0,635*		0,869*	
Início dos sintomas	0,363*		0,485*		1*		0,227*	
Diagnóstico	0,506*		0,754*		1*		1*	
Início dos sintomas digestivos	0,066*	0,132	0,301*	0,401	0,603*	0,603	0,02*	0,08
Início dos sintomas pulmonares	0,819*		1*		0,405*		0,604*	
Índice de massa corpórea	0,529*		1*		0,155*		0,263*	
Polipose nasal	0,765*		0,648*		0,574*		0,649*	
Diabetes mellitus	0,792*		0,15*		0,234*		1*	
Osteoporose	0,499*		0,676*		0,677*		0,278*	
Insuficiência pancreática	1*		0,234*		0,42*		1*	
Íleo meconial	0,529*		1*		1*		0,336*	
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,63*		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,652*		0,763*		1*		0,615*	
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,343*		0,528*		1*		0,864*	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,745*		1*		-		0,776*	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,154*		0,208*		1*		0,823*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,762*		0,676*		0,67*		0,673*	
SA+PA	0,518 [#]		0,563 [#]		0,117 [#]		0,259 [#]	
Bactéria	0,645 [#]		0,475 [#]		0,806 [#]		0,77 [#]	
SaO ₂	0,451		0,097		0,833		0,509	
Bhalla	0,313		1		0,943		0,391	
Kanga	0,646		0,869		0,643		0,584	
Shwachman-Kulczycki	0,494		0,531		0,461		0,482	
CVF	0,227		0,305		0,297		0,066	
VEF ₁	0,329		0,411		0,141		0,073	
VEF ₁ /CVF	0,816		0,704		0,064		0,7	
FEF _{25%}	0,98		0,746		0,391		0,969	
FEF _{50%}	0,722		0,812		0,156		0,503	
FEF _{75%}	0,906		0,464		0,539		0,549	
FEF _{25-75%}	0,767		0,562		0,114		0,215	
FEF _{max}	0,457		0,359		0,461		0,201	
VRE	0,799		0,675		0,376		0,764	
Pós Broncodilatador								
CVF	0,562		0,356		0,646		0,598	
VEF ₁	0,506		0,593		0,234		0,654	
VEF ₁ /CVF	0,624		0,835		0,527		0,532	
FEF _{25%}	0,823		0,375		0,393		0,746	
FEF _{50%}	0,162		0,403		1		0,555	
FEF _{75%}	0,074		0,527		1		0,104	
FEF _{25-75%}	0,418		0,379		0,799		0,97	
FEF _{max}	0,683		0,86		1		0,866	
VRE	0,806		0,106		0,25		0,636	

SLC9A3, Solute carrier family 9 member A3; p^c, p corrigido; MI, mutação identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; MNI, mutação não identificada no gene *CFTR* pertencente a classe I, II e/ou III; SaO₂, saturação de oxigênio transcutânea; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Análise estatística dos dados categóricos foi realizada pelo teste χ^2 por razão de verossimilhança[#] e pelo teste exato de Fisher* e dos dados numéricos pelo teste de Mann-Whitney. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A correção para múltiplos testes foi realizada pelo *False Rate Discovery test*.

Apêndice 14. Valores de p para análise de interação das variantes rs3788766 (*SLC6A14*), rs7512462 (*SLC26A9*), rs17235416 (*SLC11A1*) e rs17563161 (*SLC9A3*) com os marcadores epidemiológicos, clínicos e laboratoriais avaliados pela ferramenta multifactor dimensionality reduction.

Variável	P-value	Variável	P-value
Sexo	0,0010	Kanga	0,9890
Raça	1	Shwachman-Kulczycki	0,9530
Idade	0,4420	CVF	0,9490
Início dos sintomas	0,6490	VEF ₁	0,9270
Diagnóstico	0,5730	VEF ₁ /CVF	0,9550
Início dos sintomas digestivos	0,2520	FEF _{25%}	0,4420
Início dos sintomas pulmonares	0,9220	FEF _{50%}	0,4950
Índice de massa corpórea	0,1590	FEF _{75%}	0,4510
Polipose nasal	0,9910	FEF _{25-75%}	0,5080
Diabetes mellitus	0,3600	FEF _{max}	0,9870
Osteoporose	0,9330	VRE	0,8950
Insuficiência pancreática	0,5340 (0,0070*)	Pós Broncodilatador	
Íleo meconial	0,8520	CVF	0,6880
1ª <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,7980	VEF ₁	0,7440
<i>P. aeruginosa</i> mucoide	0,0500	VEF ₁ /CVF	0,9420
<i>P. aeruginosa</i> não mucoide	0,8430	FEF _{25%}	0,9780
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0,9220	FEF _{50%}	0,7090
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,7590	FEF _{75%}	0,7040
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,9740	FEF _{25-75%}	0,7620
SaO ₂	0,9980	FEF _{max}	0,9790
Bhalla	0,9510	VRE	0,7890

SLC6A14, Solute Carrier Family 6 (amino acid transporter), Member 14; *SLC26A9*, Solute Carrier Family 26, Member 9; *SLC11A1*, Solute Carrier Family 11 (Proton-Coupled Divalent Metal Ion Transporter), Member 1; região 2q35; *SLC9A3*, Solute carrier Family 9, subfamily A (*NHE3*, cation proton antiporter 3), member 3; SaO₂, saturação transcutânea de oxigênio da hemoglobina; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo da CVF; FEF_{25%}, fluxo expiratório forçado a 25% da CVF; FEF_{50%}, fluxo expiratório forçado a 50% da CVF; FEF_{75%}, fluxo expiratório forçado a 75% da CVF; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado médio entre 25% e 75% da CVF; FEF_{max}, fluxo expiratório forçado máximo; VRE, volume de reserva expiratória; SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*. Os dados com valores positivos estão apresentados em negrito. A análise estatística foi realizada pelos softwares *multifactor dimensionality reduction* e *multifactor dimensionality reduction permutation test*. Os dados com valor de p positivo estão apresentados em negrito na tabela.

ANEXO 1

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos na Família de Genes SLC (SLC26A9, SLC9A3 e SLC6A14) e Gravidade Clínica da Fibrose Cística

Pesquisador: Stéphanie Villa-Nova Pereira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 38162914.3.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 948.757

Data da Relatoria: 01/02/2015

Apresentação do Projeto:

A fibrose cística (FC) é uma doença progressiva, com padrão de herança monogênico, mas está associada com manifestações clínicas variáveis. No amplo espectro clínico de apresentação, as alterações pulmonares representam a principal causa de morbimortalidade pela doença. Além das mutações no gene CFTR, que estão relacionadas à manifestação da FC, polimorfismos em outros genes também devem ser considerados, por serem variáveis moduladoras, principalmente, mas não exclusivamente, da gravidade clínica da doença pulmonar na FC. Logo, a genotipagem de polimorfismos nos genes da família de transportadores de soluto (SLC) tem por objetivo correlacioná-los com marcadores clínicos de gravidade da FC, a fim de melhor entender as variáveis da doença. A população sob estudo está em acompanhamento em um centro de referência do estado de São Paulo. Para compor a amostra, os pacientes serão agrupados de acordo com a presença das mutações no gene CFTR (considerando a classe da mutação) e os polimorfismos associados diretamente com a gravidade da doença, bem como, divididos em grupos de acordo com as mutações no gene CFTR. Os dados serão comparados estatisticamente, através dos testes paramétricos e não paramétricos convencionais.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 948.757

Objetivo da Pesquisa:

- Investigar os polimorfismos nos genes SLC26A9, SLC9A3 e SLC6A14, em uma população de pacientes portadores de fibrose cística, provenientes de um hospital de referência.
- Verificar se existe associação destes polimorfismos com os diferentes marcadores clínicos da doença, principalmente pulmonar.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco físico com relação aos pacientes é inexistente, devido as amostras serem oriundas de banco de dados. O risco de "não anonimato" dos sujeitos da pesquisa é baixo, tendo em vista que as amostras recebem um código no cadastro que é utilizado durante todo o processo de manipulação da mesma.

Benefícios:

Tendo em vista que a Fibrose Cística é uma doença monogênica com gravidade clínica variável, a genotipagem dos polimorfismos abordados poderá esclarecer melhor alguns aspectos, proporcionando aos pacientes maiores informações acerca da doença, tendo em vista que os pacientes serão informados de resultados relevantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa de dispensa de TCLE:

"As amostras já encontram-se armazenadas, sob o consentimento dos pacientes e/ou responsáveis (em caso de pacientes com menos de 18 anos) por assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no banco de DNA do Laboratório de Genética Molecular, sob a responsabilidade da Profa Dra Carmen Silva Bertuzzo".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

- Folha de Rosto assinada pela pesquisadora principal e pelo diretor da Faculdade de Ciências Médicas. Como se trata de estudo realizado a partir de amostras já colhidas e autorizadas pelos sujeitos da pesquisa, cuja guarda e acondicionamento está sob responsabilidade da orientadora, o documento foi considerado adequado às normas do sistema CEP-CONEP.
- projeto original detalhado e o formulário gerado pela Plataforma Brasil- ambos readequados, contemplando na atual versão os itens obrigatórios exigidos no sistema CEP-CONEP e na Res. CNS466-2012.
- regulamento do biorepositório associado ao projeto.
- Há solicitação de dispensa de apresentação de TCLE, considerando que material biológico está

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 948.757

arquivado em biorepositório específico.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado após resolução satisfatória de pendências, com dispensa de apresentação de TCLE.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

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

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 948.757

protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 09 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br