UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA BEATRIZ HORTENSE

Aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com Pneumonia
Intersticial Familiar

Ribeirão Preto, SP
2018

ANA BEATRIZ HORTENSE

Aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com Pneumonia
Intersticial Familiar

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica.

Área de concentração: Investigação Clínica.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Baddini
Martinez

Ribeirão Preto, SP
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Hortense, Ana Beatriz

Aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com Pneumonia Intersticial Familiar. Ribeirão Preto, 2018.

111 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica – Investigação Clínica.

Orientador: Baddini-Martinez, José Antônio.

1. Pneumonia Intersticial Familiar. 2. Fibrose Pulmonar. 3. Genética. 4. Telômeros.

Nome: Hortense, Ana Beatriz

Título: Aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com Pneumonia Intersticial Familiar.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Área de concentração: Investigação Clínica.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste trabalho. São inúmeras pessoas que participaram de algum capítulo da minha vida e, dessa forma, me ensinaram tudo o que sei hoje. As páginas dessa tese seriam insuficientes para descrever seus nomes e sua importância. Minha gratidão a vocês será eterna.

Um agradecimento especial a todos os professores e mestres que me ensinaram e orientaram desde de o início das primeiras palavras até, finalmente, a confecção desta tese. Minha esperança é que a sociedade, um dia, reconheça seu grande valor.

Ao Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez, meu orientador, que cumpriu este papel com muito ânimo e empenho, estando sempre presente e disponível mesmo quando maiores problemas exigiam sua atenção. Ficam aqui documentados minha gratidão, admiração e respeito.

Aos docentes, médicos contratados e a todos os funcionários da Seção de Pneumologia, que muito me ensinaram e incentivaram.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Calado e a equipe do Laboratório de Hematologia (Bárbara, Flávia, Rita e André), que tornaram possível a análise genética deste projeto.

Aos Prof. Dr. Marcel Koenigkam Santos, Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro e Dr. Danilo Wada, por toda a contribuição científica.

A todos os pacientes e familiares que participaram desta pesquisa. Agradeço a disponibilidade e a confiança.

À Deus, à minha família, ao Sérgio e aos meus amigos, pois sem amor, eu nada seria.

RESUMO

HORTENSE, Ana Beatriz. **Aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com Pneumonia Intersticial Familiar**. 2018. 111 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Pneumonia intersticial familiar (PIF) é definida como a ocorrência de pelo menos dois casos de pneumonia intersticial fibrosante em uma mesma família biológica. Apesar do avanço sobre o tema em anos recentes, ainda não há estudos brasileiros nessa área. O objetivo deste estudo foi caracterizar uma amostra de pacientes brasileiros com PIF quanto aos aspectos clínicos, radiológicos, anatomopatológicos e genéticos, bem como analisar os respectivos comprimentos teloméricos (CT). Entre março de 2014 e novembro de 2017 foi realizada uma busca ativa por casos de PIF. Os pacientes identificados foram submetidos a testes de função pulmonar; tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) de tórax e a coleta de amostras de sangue. Ainda foram realizadas avaliações empregando ficha clínica padronizada. Amostras de tecido pulmonar foram obtidas e revisadas em seis casos. Empregando-se um *kit* apropriado, DNA genômico foi extraído de células brancas do sangue periférico. A avaliação do CT foi feita pelo método de *Southern blot*. Um painel envolvendo 154 genes de interesse foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa e construído pela empresa *Agilent Technologies*. A pesquisa desses genes foi realizada empregando-se técnicas de sequenciamento de nova geração (*NGS-Illumina*). Foram selecionados 35 pacientes, com idade mediana de 66 (35,5-89,3) anos. Tabagismo e outras exposições ambientais estiveram presentes em 45,7% e 80% dos casos, respectivamente. Estertores finos foram identificados em 91,4% dos pacientes e baqueteamento digital em 20%. Os testes de função pulmonar foram classificados como restritivos em 20 (57,1%), normais em 10 (28,6%), inespecíficos em 4 (11,45) e obstrutivo leve em 1 (2,9%). A DCO esteve reduzida nos 30 pacientes em que foi possível pesquisá-la. Padrão típico de PIU na TCAR foi detectado em 6 (17,1%) pacientes e padrão indeterminado para PIU em outros 4 (11,4%). A maioria dos casos, 25 (71,4%), exibiu padrão tomográfico

inconsistente com PIU. A revisão do material anatomopatológico revelou pneumonite intersticial com acentuação bronquiocêntrica em quatro indivíduos. A grande maioria (85,7%) mostrou CTs inferiores ao percentil 50%. Quatro indivíduos exibiram CTs curtos e um muito curto. Foram identificadas variantes genéticas comuns no promotor do gene MUC5B (rs35705950), nos genes TOLLIP (rs111521887, rs5743894 e rs5743890) ou TERT (rs2736100) em 90% dos casos. Detectaram-se ainda sete variantes raras distintas. As alterações c.2594G>A e c.2146G>A do gene TERT, e c.394C>T do gene RTEL1, previamente descritas e associadas a telomeropatias. Uma anormalidade de TERT (c.1730G>A) e outra de RTEL1 (c.2299C>T) inéditas. Duas outras variantes raras encontradas já conhecidas, ainda não haviam sido associadas a doenças pulmonares: gene SHQ1 (c.828_831del) e gene WRAP53 (c.1558dupG). Em conclusão, pacientes brasileiros com PIF demonstram acentuada heterogeneidade fenotípica e genotípica. Este estudo identificou ainda duas novas variantes genéticas raras associadas a PIF e dois possíveis novos genes implicados na patogênese dessa doença.

Palavras-chave: Pneumonia Intersticial Familiar. Fibrose pulmonar. Genética. Telômeros.

ABSTRACT

HORTENSE, Ana Beatriz. **Clinical and genetic features of Brazilian patients with Familial Interstitial Pneumonia**. 2018. 111 f. Thesis (PhD in Internal Medicine) Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Familial interstitial pneumonia (FIP) is defined as the occurrence of at least two cases of interstitial fibrosing pneumonias in the same biological family. Despite advances in the field in recent years, there are no Brazilian studies in this area. The aim of this study was to characterize a sample of Brazilian patients with PIF regarding clinical, radiological, histological and genetic aspects, as well as to analyze the respective telomeric lengths (TL). Between March 2014 and November 2017 an active search was conducted for FIP cases. The patients identified were submitted to pulmonary function tests, high resolution computed tomography (HRCT) of the chest and the collection of blood samples. In addition, a standardized clinical file was also fulfilled. Pulmonary tissue samples were obtained and reviewed in six cases. Using a suitable kit, genomic DNA was extracted from white peripheral blood cells. The TL measurements were done by Southern blot method. A panel of 154 genes of interest was developed by the research group and built by Agilent Technologies. Research on these genes was carried out using next generation sequencing techniques (NGS-Illumina). Thirty-five patients were selected, with a median age of 66 (35.5-89.3) years. Smoking and other environmental exposures were present in, respectively, 45.7% and 80% of the cases. Fine crackles were identified in 91.4% of patients and digital clubbing in 20%. Pulmonary function tests were classified as restrictive in 20 (57.1%), normal in 10 (28.6%), non-specific in 4 (11.45) and mild obstructive in 1 (2.9%). The DLCO was reduced in the 30 patients in whom it was possible to investigate it. Typical pattern of UIP in HRCT was detected in 6 (17.1%) patients and undetermined pattern for UIP in another 4 (11.4%). The majority of cases, 25 (71.4%), showed a tomographic pattern inconsistent with UIP. The review of histological material revealed interstitial pneumonitis with bronchiolocentric accentuation in four individuals. The vast majority (85.7%) showed TL lower than the 50th percentile. Four individuals had short TL and one a very short TL. Common

genetic variants were identified in the MUC5B gene promoter (rs35705950), in the TOLLIP genes (rs111521887, rs5743894 and rs5743890) or TERT (rs2736100) in 90% of the cases. Seven different rare variants were also detected: the changes c.2594G> A and c.2146G> A of the TERT gene, and c.394C> T of the RTEL1 gene, previously described and associated with telomeropathy; one previously unknown abnormality of TERT (c.1730G> A) and another of RTEL1 (c.2299C> T); two additional rare genetic variants, had not yet been associated with pulmonary diseases: SHQ1 gene (c.828_831del) and WRAP53 gene (c.1558dupG). In conclusion, FIP Brazilian patients demonstrate marked phenotypic and genotypic heterogeneity. This study also identified two new rare genetic variants associated with FIP and two other possible new genes implicated in the pathogenesis of this disease.

Keywords: Familial Interstitial Pneumonia. Pulmonary fibrosis. Genetics. Telomeres.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais variantes genéticas comuns associadas a FPI e PIF.....	22
Quadro 2 – Critérios da tomografia computadorizada de alta resolução do tórax para classificação de padrão de Pneumonia Intersticial Usual.....	34
Quadro 3 – Genes que compõem o painel personalizado utilizado para investigação de variantes genéticas nos pacientes com Pneumonia Intersticial Familiar.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Variantes genéticas de risco para fibrose pulmonar.....	23
Figura 2 – Complexo da telomerase.....	25
Figura 3 – Padrões tomográficos observados em três pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	50
Figura 4 – Aspectos histopatológicos de dois pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	52
Figura 5 – Heredograma da família do caso índice de Pneumonia Intersticial Familiar com a variante genética rara descoberta no gene TERT.....	57
Figura 6 – Heredograma da família do caso índice de Pneumonia Intersticial Familiar com a variante genética rara descoberta no gene RTEL1.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comprimentos teloméricos de glóbulos brancos de sangue periférico de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar determinados pelo método de <i>Southern blot</i>	53
Gráfico 2 – Frequências alélicas das variantes comuns nos 33 pacientes casos índices de Pneumonia Intersticial Familiar e nos bancos de dados populacionais do genoma humano.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	46
Tabela 2 – Função pulmonar de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	47
Tabela 3 – Resultados da função pulmonar de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar classificados em categorias.....	48
Tabela 4 – Padrões tomográficos de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	49
Tabela 5 – Padrões anatomopatológicos de seis pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	51
Tabela 6 – Variantes genéticas comuns encontradas em 33 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	54
Tabela 7 – Variantes genéticas raras encontradas em 33 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar.....	55
Tabela 8 – Características clínicas, funcionais, radiológicas e comprimento telomérico em quatro pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar com as novas variantes genéticas raras descobertas em associação com a doença.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA3 – *ATB-binding Cassette sub-family A3*

BR-DIP – Bronquiolite Respiratória – Doença Intersticial Pulmonar

CADD - *Combined Annotation Dependent Depletion*

CPT – Capacidade Pulmonar Total

CT – comprimento telomérico

CVF – Capacidade Vital Forçada

DAD – Dano Alveolar Difuso

DC – Disceratose Congênita

DCO – capacidade de difusão de monóxido de carbono

DIP – Doença Intersticial Pulmonar

DKC1 – *Dyskerin Pseudouridine Synthase 1*

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

FEPP – Fibroelastose Pleuroparenquimatosa

FPI – Fibrose Pulmonar Idiopática

GnomAD – *Genome Aggregation Database*

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Het – heterozigotos

Homo – homozigotos

IAMSPE – Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual

MRCm – *Medical Research Council* modificada

MUC5B – *Mucin 5B*

NAF1 – *Nuclear Assembly Factor 1 Ribonucleoprotein*

NGS – *Next-Generation Sequencing*

OD – *odds ratio*

P – percentil

PARN – *Poly(A)-specific Ribonuclease*

PCR – reação em cadeia da polimerase

PH – Pneumonia de Hipersensibilidade

PID – Pneumonia Intersticial Descamativa

PIF – Pneumonia Intersticial Familiar

PII – Pneumonia Intersticial Idiopática
PIL – Pneumonia Intersticial Linfocítica
PINE – Pneumonia Intersticial Não Específica
PIU – Pneumonia Intersticial Usual
PO – Pneumonia Organizante
RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RTEL1 – *Regulator of Telomere Elongation Helicase 1*
SFTPA2 – *Surfactant Protein A 2*
SFTPC – *Surfactant Protein C*
SHQ1 – *H/ACA Ribonucleoprotein Assembly Factor*
SNP – *single nucleotide polymorphisms*
SpO2 – saturação periférica de oxigênio
TCAR – Tomografia computadorizada de alta resolução
TERC – *Telomerase RNA Component*
TERT – *Telomerase Reverse Transcriptase*
TGF- β - fator transformador de crescimento β
TINF2 – *TRF1-Interacting Nuclear Factor 2*
TOLLIP – *Toll Interacting Protein*
TRF – fragmento de restrição telomérico
USP – Universidade de São Paulo
VEF1 – Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
WRAP53 – *WD Repeat Containing Antisense to TP53*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1.Pneumonia intersticial familiar.....	18
1.2.Genes relacionados ao complexo da telomerase.....	23
1.3.Genes relacionados às proteínas do surfactante.....	26
1.4.Variantes genéticas comuns.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Delineamento do estudo e participantes.....	31
3.2. Ficha de avaliação clínica padronizada.....	32
3.3. Prova de função pulmonar.....	32
3.4. Tomografia computadorizada de tórax.....	33
3.5. Medida do comprimento telomérico dos leucócitos.....	35
3.6. Estudos genéticos.....	37
3.7. Exames anatomopatológicos.....	42
3.8. Aspectos estatísticos.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1.Características clínicas.....	45
4.2.Características funcionais.....	47
4.3.Avaliação radiológica.....	49
4.4.Achados anatomopatológicos.....	51
4.5.Análise do comprimento telomérico.....	53
4.6.Avaliação genética.....	54
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICE.....	92
ANEXOS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pneumonia Intersticial Familiar

O interesse no estudo da Pneumonia Intersticial Familiar (PIF) teve início nas últimas décadas, concomitante com o surgimento dos crescentes conhecimentos sobre Genética Humana. Os relatos de casos de doença fibrosante pulmonar observados dentro de uma mesma família, entre os anos 1950 e 1970, atentou para possíveis causas genéticas para aquele tipo de doença (BONANNI; FRYMOYER; JACOX, 1965; PEABODY et al., 1950). Desde então, a pesquisa genética em PIF pareceu um caminho promissor para se descobrirem as bases fisiopatológicas, até hoje pouco conhecidas dos quadros de fibrose pulmonar.

Devido ao fato de a atenção à PIF ser relativamente recente, sua definição ainda não foi consolidada pelas diretrizes atuais. De acordo com um grupo de sociedades médicas internacionais, em 2011, os critérios utilizados para se definir Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI) são os mesmos para os casos familiares e esporádicos, sendo ambos clinicamente e histologicamente indistinguíveis, e Fibrose Pulmonar Familiar foi o termo adotado para os casos de acometimento por FPI de dois ou mais membros de uma mesma família biológica (RAGHU et al., 2011).

Tal definição, contudo, vai de encontro com publicações recentes sobre PIF. A heterogeneidade dos fenótipos clínicos tem sido consistentemente demonstrada nas famílias. No estudo com maior casuística de PIF já realizado (111 famílias, 353 indivíduos afetados), foram observados diferentes padrões patológicos: Pneumonia Intersticial Usual (PIU) em 85% dos indivíduos, Pneumonia Intersticial Não Específica (PINE) em 10% e Pneumonia Organizante (PO) em 2%. E ainda, as tomografias computadorizadas de alta resolução (TCAR) do tórax mostraram padrão de PIU em 78% dos casos, PINE em 5% e padrão não classificável em 16%. Cabe ainda ressaltar que a heterogeneidade fenotípica, considerando-se a análise dos padrões tomográficos, foi observada em 45% das famílias estudadas (STEELE et al., 2005).

Em outro estudo, 115 indivíduos com fibrose pulmonar de 64 famílias com mutações em um gene ligado à biologia dos telômeros foram estudados (NEWTON et al., 2016). Desses, 77 indivíduos tiveram dados clínicos para se chegar a um

diagnóstico multidisciplinar. O resultado final foi de 45,5% dos indivíduos com diagnóstico de FPI; 19,5%, com padrão não classificável; 11,5%, com Pneumonia de Hipersensibilidade (PH) crônica; 10,4%, de Fibroelastose Pleuroparenquimatosa (FEPP); 6,5%, de Doença Intersticial Pulmonar (DIP) com aspectos de autoimunidade; 2,6%, de PINE; 2,6%, de DIP associada a colagenoses e 1,3%, de Pneumonia Intersticial Descamativa (PID).

A diversidade de apresentações histopatológicas na PIF foi também documentada, revisando-se as biópsias pulmonares de 30 indivíduos com PIF, nas quais um diagnóstico de fibrose parenquimatosa não classificável foi estabelecido em 60% dos casos, e PIU em menos da metade dos indivíduos estudados (LESLIE et al., 2012).

Dessa forma, a definição mais adequada de PIF é aquela sugerida por Steele et al. (2005), segundo a qual, a doença se caracteriza pela presença de pelo menos dois casos de doença fibrosante pulmonar dentro de uma mesma família biológica. Tal definição, além de simples, não restringe o conceito de PIF ao de FPI. De acordo com ela, em uma mesma família é possível observar diferentes padrões de DIP, tanto de causas conhecidas (por exemplo, associadas a doenças do colágeno, PH, asbestose) como também de causas desconhecidas, as ditas “idiopáticas” (BORIE et al., 2015). Em função do exposto, no presente texto, optou-se por utilizar a expressão FPI para designar unicamente casos esporádicos de PIU idiopática.

Todas essas observações reforçam a hipótese de que a interação de múltiplos fatores, genéticos e ambientais determina o fenótipo de um indivíduo acometido (TZOUVELEKIS; KAMINSKI, 2015).

De acordo com estudos realizados em diferentes países, a prevalência de PIF variou de 2 a 20% dos indivíduos que apresentavam diagnóstico de FPI (HODGSON; LAITINEN; TUKIAINEN, 2002; LAWSON; LOYD, 2006; LOYD, 2003; MARSHALL et al., 2000). No entanto, tal proporção chegou a 36% de casos familiares em um estudo de coorte em *Newfoundland*, Canadá. Este achado foi atribuído ao fato de esta ser uma amostra etnicamente homogênea e extraída de uma população fundadora (FERNANDEZ et al., 2012).

O que tem sido observado na prática clínica é que muitos pacientes que se apresentam inicialmente com o diagnóstico de Pneumonia Intersticial Idiopática (PII) esporádica, acabam identificando algum parente acometido por uma DIP durante o seu seguimento, não raramente muitos anos após a primeira consulta. Tal fato foi

observado no estudo de Kropski et al. (2017), em que, dentre os pacientes com FPI esporádica, mais de 10% tiveram um parente diagnosticado com PII durante o acompanhamento. Esse fato ilustra a importância de se pesquisar a história familiar dos pacientes com pneumopatias intersticiais, não apenas na primeira consulta, mas também nas consultas subsequentes, instigando o paciente a procurar outros casos na família. Ele também ressalta a possibilidade de que a real prevalência da PIF ainda esteja subestimada, conforme dados compilados até o momento.

Os casos de PIF tendem a ter o diagnóstico feito em uma idade mais precoce, quando comparado aos casos de PII esporádicas, com diferença na média de idade variando de 3,5 a 12 anos (HODGSON; LAITINEN; TUKIAINEN, 2002; LEE et al., 2005; MARSHALL et al., 2000; VAN MOORSEL et al., 2010; YANG et al., 2007). Por outro lado, em um estudo a idade média de familiares acometidos pela doença foi em torno de 68 anos e a dos não acometidos em torno de 53 anos (STEELE et al., 2005). Não foram observadas diferenças na sobrevida entre o grupo de casos esporádicos e o de casos familiares, no entanto, o impacto dos diferentes fatores genéticos não foi considerado nas análises dessas séries de casos relatadas (LEE et al., 2005). O tabagismo, um fator de risco bem conhecido para o desenvolvimento de FPI, também mostrou associação com a PIF, indicando que ele pode ser importante fator ambiental para desencadeamento do processo patológico (STEELE et al., 2005; ROSAS et al., 2007).

A observação das famílias até hoje documentadas sugere uma transmissão autossômica dominante, com penetrância incompleta, em 80% dos casos (STEELE et al., 2005). Mutações em genes atualmente relacionados com PIF são identificadas em aproximadamente 20% das famílias afetadas (BORIE et al., 2015). Apesar de vários estudos de diferentes coortes contribuírem com números crescentes de novas associações, a busca das causas genéticas para a grande maioria dessas famílias ainda representa um grande desafio aos pesquisadores.

Os mecanismos pelos quais tais alterações genéticas resultam no desenvolvimento da doença ainda estão longe de ser completamente entendidos. Muitas teorias sugerem uma complexa interação entre agressões ambientais, alterações genéticas e regulação epigenética (TZOUVELEKIS; KAMINSKI, 2015). Tudo isso justificaria a heterogeneidade da doença e as dificuldades em se entender sua transmissão entre diferentes gerações e também em se identificarem as causas genéticas para a grande maioria dos casos de PIF.

Até o momento foram descritas variantes genéticas raras, que são aquelas com frequências alélicas inferiores a 0,1%, em nove genes que estão ligados ao desenvolvimento da PIF, incluindo três relacionados a produção do surfactante: SFTPA2, SFTPC e ABCA3; bem como sete genes relacionados aos telômeros e ao complexo da telomerase: TERT, TERC, DKC1, TINF2, RTEL1, PARN e NAF1 (ALDER et al., 2013, 2014; ARMANIOS et al., 2007; CAMPO et al., 2014; COGAN et al., 2015; EPAUD et al., 2014; FUKUHARA et al., 2013; HISATA et al., 2013; KANNENGIESSER; BORIE; REVY, 2014; KROPSKI et al., 2014; NOGEE et al., 2001; ONO et al., 2011; STANLEY et al., 2016; STUART et al., 2015; THOMAS et al., 2002; TSAKIRI et al., 2007; VAN MOORSEL et al., 2010; WANG et al., 2009).

Além disso, também foram descritas associações com variantes genéticas comuns, aquelas cuja menor frequência alélica é superior a 5%, em diversos *loci*, sendo muitas delas em alguns dos genes descritos acima. No Quadro 1, é possível observar melhor tais variantes e seus respectivos *loci*. Juntas, elas poderiam explicar aproximadamente 30% dos casos de PIF (FINGERLIN, et al., 2013).

Quadro 1 – Principais variantes genéticas comuns associadas a FPI e PIF

Locus	Gene	Variante
2q14.2	<i>IL1RN</i>	rs408392 rs419598 rs2637988
3q26.2	<i>TERC</i>	rs6793295
4q13.3	<i>IL8</i>	rs4073 rs2227307
4q22.1	<i>FAM13A</i>	rs2609255
4q35.1	<i>TLR3</i>	rs3775291
5p15.33	<i>TERT</i>	rs2736100
6p21.2	<i>CDKN1A</i>	rs2395655 rs733590
6p21.31	<i>DRB1</i>	DRB1*1501 DQB1*0602
6q24.3	<i>DSP</i>	rs2076295
10q24	<i>OBFC1</i>	rs11191865
11p15.5	<i>MUC5B</i> <i>MUC2</i> <i>TOLLIP</i>	rs35705950 rs7934606 rs111521887 rs5743894 rs2743890
13q34	<i>ATP11A</i>	rs1278769
14q21	<i>MDGA2</i>	rs7144383
17p13.1	<i>TP53</i>	rs12951053 rs12602273
17q21	<i>MAPT</i>	rs1981997
17q21.31	<i>SPPL2C</i>	rs17690703
19q13	<i>DPP9</i>	rs12610495
19q13.1	<i>TGFB1</i>	rs1800470

Fonte: Adaptado de Kropski, Blackwell e Loyd (2015) e Spagnolo e Cottin (2016).

Segundo modelos propostos, as variantes genéticas raras teriam um maior efeito determinante no desenvolvimento da fibrose pulmonar, ao contrário das variantes comuns, que, para levar à doença, teriam uma participação mais marcante dos fatores ambientais, conforme ilustrado na Figura 1 (BORIE et al., 2015).

Figura 1 – Variantes genéticas de risco para fibrose pulmonar

Variantes genéticas raras são menos frequentes na população, porém possuem maior efeito determinante no aparecimento da doença. Ao contrário, as variantes comuns são frequentes na população geral e possuem influência menor para o surgimento da doença.

Fonte: Adaptado de Mathai et al. (2016).

As alterações em genes relacionados ao complexo telômero-telomerase são as mais comumente observadas nas famílias com PIF, podendo ser observadas em pelo menos um terço das famílias (MERCK; ARMANIOS, 2016).

1.2. Genes relacionados ao complexo da telomerase

Telômeros são estruturas compostas de proteínas e DNA que protegem o final dos cromossomos da degradação e fusão; possuem, portanto, um papel essencial na manutenção da integridade genômica. Sem os telômeros, material genético seria perdido a cada ciclo de replicação celular. Isso porque a DNA polimerase requer um *primer* de RNA como amostra, para iniciar a replicação do DNA. O *primer* se dissocia, conforme a DNA polimerase se move ao longo da fita de amostra, deixando para trás uma lacuna ao final do cromossomo. Como resultado, a nova fita recém-sintetizada é mais curta do que a amostra original. Os telômeros e a telomerase amenizam esse problema, ao providenciar amostras repetitivas por

reparo enzimático nos finais dos cromossomos, evitando assim a perda de informação geneticamente codificada durante as mitoses (CALADO; YOUNG, 2009).

Os telômeros são compostos por milhares de repetições em *tandem* da sequência de nucleotídeos TTAGGG. São organizados em fita dupla de DNA telomérico e apresentam, em sua terminação, uma estrutura em forma de *t-loop*, cuja função é impedir o reconhecimento das extremidades teloméricas pela maquinaria de reparo do DNA (CALADO; YOUNG, 2009, 2012; PALM; DE LANGE, 2008). Um grupo de seis proteínas (shelterinas) está associado ao DNA telomérico, formando um complexo denominado coletivamente de telossomo. As shelterinas são formadas pelas proteínas TRF1, TRF2 e POT1, que reconhecem diretamente as repetições TTAGGG, e TPP1, Rap1 e TIN2 (codificada pelo gene TINF2), que fazem a conexão entre telômeros e proteínas (LANSDORP et al., 1996).

Devido à natureza unidirecional de duplicação do DNA, os telômeros não são replicados completamente durante a divisão celular, havendo uma perda média de 50 a 100 pares de bases na extremidade 3' a cada ciclo de divisão (COLLINS; MITCHELL, 2002). Quando o telômero é muito curto, ele sinaliza para a célula interromper a proliferação celular, indica também sua senescência e induz à apoptose (CALADO; YOUNG, 2009).

Para evitar o desgaste dos telômeros, células germinativas e algumas células somáticas expressam a enzima denominada telomerase, responsável por catalisar a síntese de DNA e, assim, manter o comprimento telomérico. A telomerase é composta por uma enzima transcriptase reversa (TERT) que usa um componente de RNA (TERC) como fita de amostra para a síntese do DNA telomérico e um conjunto de proteínas que auxiliam na estabilização do complexo, dentre elas estão NOP10, NHP2, GAR e discerina (CALADO; YOUNG, 2008; COHEN et al., 2007; COLLINS; MITCHELL, 2002; GOMEZ et al., 2012). Outras proteínas também contribuem para a estabilidade e a homeostase dos telômeros, como a DNA helicase RTEL1 e as proteínas CTC1 e TCAB1 (GRAMATGES; BERTUCH, 2013). A Figura 2 ilustra a estrutura básica do complexo da telomerase.

Figura 2 – Complexo da telomerase

Enzima telomerase transcriptase reversa (TERT), o componente de RNA (TERC), a proteína discerina e outras proteínas associadas à estabilização do complexo da telomerase (NHP2, NOP10 e GAR1). Fonte: Adaptado de Calado e Young (2009).

A Disceratose Congênita (DC) foi a primeira doença a ser relacionada com uma mutação do gene do telômero, o DKC1, que codifica a discerina, uma proteína do complexo da telomerase (HEISS et al., 1998). Esta é uma doença de incidência bastante rara e é classicamente definida pelas seguintes manifestações mucocutâneas: hiperpigmentação da pele, leucoplaquia oral e unhas distróficas (CALADO; YOUNG, 2009). Foi então observado que aproximadamente 20% dos pacientes com a moléstia desenvolviam fibrose pulmonar e também que relatos de história familiar de pneumonias intersticiais nestes pacientes eram frequentes (ARMANIOS et al., 2005; DOKAL, 2000; QAZILBASH et al., 1997; VULLIAMY et al., 2001). Estas associações levaram à descoberta das mutações em genes relacionados ao complexo da telomerase em 8-15% dos pacientes com PIF e 1-3% dos casos de FPI (ALDER et al., 2008; ARMANIOS et al., 2007; CRONKHITE et al., 2008; TSAKIRI et al., 2007).

As mutações associadas à telomerase levam ao encurtamento telomérico no sangue periférico e no tecido pulmonar, mas esse achado não é exclusivo dos portadores de mutações (ALDER et al., 2008; ARMANIOS, 2012; CRONKHITE et al., 2008; TSAKIRI et al., 2007). Pacientes com FPI e PIF tiveram seus telômeros significativamente mais curtos em leucócitos de sangue periférico e células epiteliais alveolares, quando comparados a indivíduos de um grupo controle pareados por idade, independente da presença de mutações nos genes da telomerase (ALDER et

al., 2008; KROPSKI et al., 2014). Além disso, o encurtamento telomérico em leucócitos parece ser preditor de pior prognóstico, conforme observado em pacientes com FPI com telômero curto, os quais tiveram pior sobrevida em relação àqueles com comprimento telomérico normal (STUART et al., 2014).

O mecanismo pelos quais tais alterações genéticas levam ao desenvolvimento da doença pulmonar ainda são pouco compreendidos. Uma das hipóteses é que a senescência prematura das células epiteliais alveolares, que ocorre devido aos defeitos na manutenção da estrutura telomérica, danifica a homeostase normal entre as células epiteliais e os mecanismos de resposta à lesão. Isso acarretaria uma ativação aberrante de fatores pró-fibróticos que poderiam levar ao remodelamento pulmonar, resultando nas lesões fibróticas (KROPSKI et al., 2013).

1.3. Genes relacionados às proteínas do surfactante

As proteínas do surfactante há muito são reconhecidas como cruciais para a manutenção da estrutura e da função alveolar. Elas são produzidas exclusivamente pelas células epiteliais alveolares do tipo II. Em 2001, foi feito o primeiro relato de mutação em SFTPC, o gene que codifica a proteína C do surfactante, em um recém-nascido e sua mãe com PIF (NOGEE et al., 2001). Subsequentemente, outros grupos também identificaram mutações associadas a PIF em SFTPC, SFTPA2, que codifica a proteína A2 do surfactante e ABCA3, que codifica uma molécula envolvida no tráfico intracelular de componentes fosfolípidos do surfactante (CAMPO et al., 2014; CROSSNO et al., 2010; ONO et al., 2011; THOMAS et al., 2002; VAN MORSEL et al., 2010; WANG et al., 2009;).

Postula-se que tais mutações culminem no acúmulo intracelular de precursores defeituosos da proteína do surfactante, levando ao estresse do retículo endoplasmático (THOMAS et al., 2002). Isso acarretaria a ativação de uma cascata de eventos que poderiam levar a apoptose da célula epitelial alveolar, além de poder causar um aumento de mediadores pró-fibróticos (LAWSON et al., 2008; MULUGETA et al., 2005; TANJORE et al., 2011).

1.4. Variantes genéticas comuns

Evidências atuais demonstram que as variantes genéticas comuns justificam o risco de PIF e PII esporádica, conjuntamente, em um terço de todos os casos (MATHAI et al., 2016). Seu efeito no aparecimento da doença é pequeno, apesar de estar presente mais frequentemente na população, sugerindo que a interação com outros fatores seja decisiva (KAUR; MATHAI; SCHWARTZ; 2017).

A variante comum mais encontrada (rs35705950), localizada na região promotora do gene *Mucin 5B* (MUC5B), tem sido associada não só como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença, como também confere um fator de proteção que se relaciona com melhor prognóstico (PELJTO et al., 2013; SEIBOLD et al., 2011). Efeito similar foi observado com a variante no gene de *Toll Interacting Protein* (TOLLIP), em que a presença do alelo menor rs5743890, apesar de associado com menor risco global da doença, foi também relacionado com aumento da mortalidade (NOTH et al., 2013).

Conforme mostrado no Quadro 1, é possível observar a diversidade de *loci* e genes afetados o que, apesar de representar um grande desafio no entendimento do papel de cada gene e de suas interações no aparecimento da doença, proporciona importantes pistas para elucidar as bases fisiopatológicas da PIF e das PII em geral.

Os avanços das tecnologias de sequenciamento de nova geração e os estudos de genoma completo contribuíram para crescentes descobertas de novas variantes genéticas nos últimos anos.

O melhor entendimento das bases genéticas da PIF permite identificar possíveis “alvos” terapêuticos, oferecendo assim a promessa de tratamentos mais eficazes, além de oferecer ao clínico informações precisas a respeito do risco da doença e de seu prognóstico, possibilitando a ele adequar suas condutas de maneira personalizada.

Dessa forma, a identificação de novos genes relacionados à PIF e um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais as variantes genéticas já encontradas afetam o desenvolvimento e a evolução da doença é uma alta prioridade.

Apesar de centros de pesquisa, ao redor do mundo, já terem avaliado amostras de populações de etnias diversas, não há até o momento nenhuma análise fenotípica e do perfil genético de pacientes brasileiros com PIF, sendo, portanto, este tipo de estudo ainda inédito no Brasil.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Caracterizar os aspectos clínicos, radiológicos e anatomopatológicos de uma amostra brasileira de pacientes casos índice de PIF;
- b) Avaliar os comprimentos teloméricos nessa amostra de pacientes;
- c) Pesquisar a ocorrência de alterações genéticas previamente descritas, e outras de caráter exploratório, associadas ao desenvolvimento da PIF.

3. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento do estudo e participantes

Trata-se de um estudo observacional, transversal, de pacientes casos índice de PIF no Brasil.

A meta foi avaliar o maior número possível de pacientes casos índice atendidos pelos serviços de Pneumologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e de outros hospitais do Brasil, independentemente de sexo, idade, ou presença de comorbidades.

Os participantes foram selecionados de acordo com os critérios diagnósticos para PIF, que foi definida pela presença de pelo menos dois casos de PII, definida ou provável, em uma mesma família, com até três graus de parentesco (STEELE et al, 2005). Para confirmação dos antecedentes familiares de DIP, além dos dados obtidos na história clínica dos pacientes, foram obtidas comprovações dos casos referidos, através da convocação e avaliação clínica destes familiares quando possível, ou então, na impossibilidade disso, através de revisões de prontuário, análise de exames radiológicos e/ou anatomopatológicos.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (número do parecer: 883.203) e do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (IAMSPE) (número do parecer: 1.508.554). O termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado e assinado por todos os participantes.

Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a protocolo de pesquisa que envolveu os seguintes itens:

- a) Preenchimento de avaliação clínica empregando-se ficha clínica padronizada;
- b) Estudos da função pulmonar;
- c) Tomografia computadorizada de tórax;
- d) Coleta de sangue para medida do comprimento telomérico e análises genéticas;
- e) Revisão das biópsias pulmonares disponíveis.

3.2. Ficha de avaliação clínica padronizada

Os dados colhidos incluíram informações demográficas, idade do início dos sintomas, idade na ocasião do diagnóstico da PIF, grau de parentesco do familiar acometido mais próximo, história de exposições ambientais e grau de dispneia avaliado pela escala *Medical Research Council* modificada (MRCm) (KOVELIS et al., 2008). Além disso, foram pesquisadas presença de tosse, expectoração, sintomas de doenças colágeno-vasculares, sibilância, estertores finos, baqueteamento digital e medida da saturação periférica de oxigênio (SpO₂) em repouso e ar ambiente, empregando-se um oxímetro de pulso da marca *Moriya*, Modelo 1001 (São Paulo, Brasil).

3.3. Prova de função pulmonar

Os voluntários foram submetidos a espirometrias em equipamentos aprovados para uso pela *American Thoracic Society*. Foi dada preferência à avaliação da função pulmonar na Seção de Pneumologia do HCFMRP-USP, empregando-se o espirômetro *Collins* modelo *GS Plus*.

Foram obtidas medidas dos volumes, fluxos e capacidades pulmonares, assim como da difusão do monóxido de carbono (DCO), seguindo normas e recomendações da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (2002).

O exame foi realizado com o indivíduo na posição sentada, com bocal acoplado e com emprego de presilha nas narinas para que não ocorresse fuga de ar. Os indivíduos receberam orientações das manobras a serem realizadas de forma vigorosa durante os ciclos inspiratórios e expiratórios. Os traçados espirométricos obtidos foram analisados para cálculo das variáveis Capacidade Vital Forçada (CVF) e Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF₁). Adicionalmente foram efetuadas ainda a determinação do Volume Residual, pelo método da diluição do gás hélio em circuito fechado, para cálculo da Capacidade Pulmonar Total (CPT), e a medida da capacidade de difusão pulmonar, empregando-se monóxido de carbono.

Os valores referenciais para os parâmetros funcionais respiratórios foram calculados a partir de equações derivadas da população brasileira (NEDER et al., 1999a, 1999b; PEREIRA; SATO; RODRIGUES, 2007).

3.4. Tomografia computadorizada de tórax

Tomografias computadorizadas de tórax com cortes de alta resolução foram realizadas preferencialmente em aparelho de multidetectores (*Brilliance Big Bore* 16 detectores, *Philips*, Holanda, ou *Aquilion Prime 160*, *Toshiba*, Japão). Foram realizadas aquisições volumétricas de 1 mm de espessura em inspiração e expiração, sem administração de meio de contraste iodado. Outros parâmetros típicos da aquisição foram: kVp de 120, mAs referência de 150-200, rotação do *gantry* de 0,3 a 0,7s e exposição à radiação menor que 5 mSv. Para os casos em que a presença de DIP nas imagens foi duvidosa, a tomografia foi repetida com o paciente em decúbito ventral. As aquisições volumétricas foram reconstruídas com filtro mole / padrão e duro, com janelas para mediastino e pulmão.

As imagens obtidas foram analisadas por dois médicos radiologistas torácicos experientes, de maneira independente, que não tiveram acesso a informações clínicas ou laboratoriais dos casos. Ao final da análise os resultados obtidos pelos dois médicos foram confrontados. No caso de classificação radiológica divergente, um resultado final consensual foi obtido através de avaliação conjunta.

As imagens foram classificadas nas seguintes categorias, seguindo os critérios de classificação radiológica, de acordo com as diretrizes de sociedades médicas internacionais (RAGHU et al., 2011):

- Compatível com PIU;
- Possível PIU;
- Inconsistente com PIU.

Tais critérios utilizados estão caracterizados no Quadro 2.

Quadro 2 – Critérios da tomografia computadorizada de alta resolução do tórax para classificação de padrão de Pneumonia Intersticial Usual

Compatível com PIU (todos os quatro aspectos)	Possível PIU (todos os três aspectos)	Inconsistente com PIU (qualquer um dos sete aspectos)
<ul style="list-style-type: none"> distribuição dos achados predominante em regiões basais e subpleurais opacidades reticulares presença de faveolamento com ou sem bronquiectasia de tração ausência de aspectos listados como inconsistentes com o padrão de PIU 	<ul style="list-style-type: none"> distribuição dos achados predominante em regiões basais e subpleurais opacidades reticulares ausência de aspectos listados como inconsistentes com o padrão de PIU 	<ul style="list-style-type: none"> predomínio nas regiões pulmonares superiores e médias predomínio peribroncovascular presença de extensas áreas de vidro fosco (maior do que as áreas de opacidades reticulares) micronódulos difusos (bilaterais, predominantemente em lobos superiores) cistos discretos (múltiplos, bilaterais, fora das áreas de faveolamento) presença de áreas de atenuação em mosaico difusas (bilateral, em três ou mais lobos) presença de consolidação em segmentos ou lobos pulmonares

Fonte: Adaptado de Raghu et al., 2011

Para melhor caracterização do grupo classificado como “possível PIU”, optou-se ainda por sua subcategorização em “provável PIU” e “PIU indeterminada”, conforme proposto por CHUNG et al. (2015). De acordo com o referido estudo, o padrão “provável PIU” esteve associado mais vezes com o padrão histológico de PIU do que o padrão tomográfico de “PIU indeterminada”, demonstrando a presença

de grupos diferentes dentro da classificação “possível PIU”, adotada pelas diretrizes de sociedades médicas internacionais (RAGHU et al., 2011).

Quando encontrado padrão “inconsistente com PIU”, o padrão radiológico foi especificado, sempre que possível, em uma das principais doenças intersticiais fibrosantes: PH, PINE, Bronquiolite Respiratória – Doença Intersticial Pulmonar (BR-DIP), PID, PO, Dano Alveolar Difuso (DAD), Pneumonia Intersticial Linfóide (PIL), FEPP (SILVA et al., 2008; TRAVIS et al., 2013). Quando as imagens tomográficas não apresentavam características específicas de nenhuma das DIP descritas acima, ou quando não houve um consenso entre os médicos radiologistas sobre em quais destes padrões as imagens se enquadravam, a TCAR foi classificada como “sem padrão característico”.

3.5. Medida do comprimento telomérico dos leucócitos

Amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa periférica dos voluntários em dois tubos de 4 mL, a vácuo, contendo o anticoagulante *EDTA K2*. As amostras foram identificadas e encaminhadas imediatamente ao laboratório da Divisão de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, onde foram armazenadas a 4°C, processadas em até 48 horas após a coleta, com extração de DNA, e submetidas às análises. Para todos os participantes, foram analisados os comprimentos médios dos fragmentos de restrição teloméricos (TRF) pelo método *Southern Blot*.

A extração do DNA das células nucleadas sanguíneas foi realizada empregando-se o *kit Gentra Puregene Blood (Qiagen, Maryland, EUA)*. Os glóbulos brancos do sangue periférico foram isolados por centrifugação da amostra, após a lise dos glóbulos vermelhos. As amostras de DNA foram quantificadas e estocadas a -20°C. O *kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha)* foi utilizado de acordo com os protocolos do fabricante.

Primeiramente, a integridade do DNA extraído (50 ng) foi avaliada em gel de agarose 1,5% em 200V, por 45 minutos. O DNA genômico (800ng) foi então digerido pela combinação das enzimas de restrição *Hinf1* e *Rsa1* (enzimas de restrição *FastDigest – Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*) por 2 horas a 37°C. Os fragmentos de DNA obtidos foram separados por eletroforese com gel de agarose 0,8%, utilizando o tampão Tris-acetato 0,04M com 0,001M de *EDTA* (pH

7,8), por 4 horas. Após corrida, o gel foi incubado em solução HCl 0,25M, solução de desnaturação (NaOH 0,5M e NaCl 3M) e depois em solução de neutralização (Tris-HCl 0,5M e NaCl 3M), 15 minutos cada.

Os fragmentos de DNA foram transferidos do gel para uma membrana de *nylon* por capilaridade e após transferência, foram fixados na membrana por UV-*crosslinking* e hibridizados com sonda telomérica específica marcada com digoxigenina, fornecida pelo *kit TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha)*. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à enzima fosfatase alcalina e posteriormente revelada por meio de catálise enzimática do substrato quimioluminescente *CDP-Star*. O sinal quimioluminescente gerado indica a localização da sonda imobilizada na membrana e, conseqüentemente, do TRF.

O comprimento médio do TRF foi determinado por meio da comparação da localização do rastro dos fragmentos de restrição na membrana com a do padrão de peso molecular aplicado juntamente com as amostras no gel de agarose.

A medida quantitativa do tamanho dos fragmentos de DNA foi realizada por meio da detecção do sinal quimioluminescente pelo fotodocumentador *ImageQuant (GE Healthcare Life Science)*. A média do TRF em kb foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{TRF} = \Sigma(\text{OD}_i) / \Sigma(\text{OD}_i / L_i),$$

onde OD_i representa o sinal quimioluminescente e L_i , o tamanho do TRF numa dada posição (i) da membrana.

Os comprimentos teloméricos dos indivíduos estudados foram analisados em função da distribuição esperada para a idade. Tais valores haviam sido previamente derivados no Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP a partir de um grupo composto por 302 indivíduos saudáveis, com idade de zero a 88 anos, recrutados entre doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto, crianças submetidas a cirurgia otorrinolológica, indivíduos atendidos no Centro de Saúde Escola e outros da comunidade da USP de Ribeirão Preto (GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014). De acordo com a distribuição dos dados obtidos nesse grupo sadio, a relação entre idade e comprimento telomérico medido pelo método de *Southern blot* é melhor

descrita por um modelo polinomial de terceiro grau dado pela seguinte equação, obtida utilizando-se o *software Microsoft Excel*® 2016:

$$y = 10,153891 - 0,169054x + 0,002951x^2 - 0,000018x^3,$$

em que a variável independente x representa a idade e y é o percentil 50% (mediana) da variável dependente “comprimento telomérico” medida em kb.

A partir dos mesmos dados, e assumindo uma distribuição normal dos tamanhos teloméricos em cada idade, foram determinadas curvas com os valores normais correspondentes aos percentis 1% (P1), 10% (P10), 90% (P90) e 99% (P99).

Valores de comprimentos teloméricos menores ou iguais ao P10 foram classificados como curtos, enquanto valores iguais ou menores a P1 foram considerados muito curtos (ALTER et al., 2007; CALADO; YOUNG, 2009; YAMAGUCHI et al., 2005).

3.6. Estudos genéticos

Foi empregado sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) para o estudo de genes associados a PIF já descritos na literatura, assim como outros selecionados pelo grupo de pesquisa para análises exploratórias. As variantes genéticas encontradas pelo sequenciamento NGS foram validadas pelo método de sequenciamento de *Sanger* (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Para os pacientes em que foram identificadas novas variantes genéticas potencialmente patogênicas, convocou-se o maior número possível de familiares para avaliação clínica, radiológica e de comprimento telomérico. Além disso, realizou-se a pesquisa, nestes familiares, da variante encontrada no caso índice, através do método de sequenciamento de *Sanger*.

3.6.1. Sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing*)

O DNA genômico total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico utilizando o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, Califórnia,

EUA). A pureza das amostras de DNA foi verificada em um espectrofotômetro (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, EUA*); sendo utilizadas apenas as amostras com razão de densidade ótica 260/280 entre 1,8 e 2. A quantificação do DNA foi realizada por fluorimetria (*Qubit, Thermo Fisher Scientific, EUA*), e a integridade foi verificada aplicando-se 50 ng das amostras em um gel de agarose (1%).

O sequenciamento incluiu três etapas principais, que estão detalhadas abaixo:

3.6.1.1 Preparação da biblioteca

Para cada amostra a ser sequenciada, uma biblioteca individual indexada foi preparada. Utilizou-se um painel de genes personalizado e desenhado pelo grupo de pesquisa para identificar variantes germinativas e *de novo* em regiões exônicas, intrônicas e/ou do promotor de 154 genes frequentemente mutados em pacientes com PII familiar e esporádicas, telomeropatias ou cânceres hematológicos. Neste painel, também foram incluídos alguns genes com associações já realizadas com evolução da doença em pacientes com PII familiar e esporádicas (Quadro 3) (KROPSKI; BLACKWELL; LOYD, 2015). Esse painel foi fabricado pela empresa *Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, EUA)* e a biblioteca foi preparada utilizando o *kit* da mesma empresa: *SureSelect QXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing Library*, sendo utilizadas as instruções do fabricante para esta etapa.

Quadro 3 – Genes que compõem o painel personalizado para investigação de variantes genéticas nos pacientes com Pneumonia Intersticial Familiar

<i>ABCA3</i>	<i>CUX1</i>	<i>GFI1</i>	<i>NPM1</i>	<i>RPS26</i>	<i>TERF2</i>
<i>ABL1</i>	<i>DCLRE1B</i>	<i>GNAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>RPS7</i>	<i>TERF2IP</i>
<i>ASXL1</i>	<i>DDX11</i>	<i>GRHL2</i>	<i>OBFC1</i>	<i>RTKL1</i>	<i>TERT</i>
<i>ATM</i>	<i>DDX41</i>	<i>HAX1</i>	<i>PALB2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TERT</i> promoter
<i>ATRX</i>	<i>DHX36</i>	<i>HRAS</i>	<i>PARN</i>	<i>RUVBL1</i>	<i>TERT</i> rs2736100
<i>BCOR</i>	<i>DIDO1</i>	<i>IDH1</i>	<i>PCNA</i>	<i>RUVBL2</i>	<i>TET2</i>
<i>BCORL1</i>	<i>DKC1</i>	<i>IDH2</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SAMD9L</i>	<i>TGS1</i>
<i>BLM</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PEG3</i>	<i>SBDS</i>	<i>THPO</i>
<i>BRAF</i>	<i>ELANE</i>	<i>IRF1</i>	<i>PHF6</i>	<i>SETBP1</i>	<i>TINF2</i>
<i>BRCA2</i>	<i>ETV6</i>	<i>JAK1</i>	<i>PIF1</i>	<i>SF3B1</i>	<i>TOLLIP</i> rs111521887
<i>BRIP1</i>	<i>EZH1</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIGA</i>	<i>SFTPA1</i>	<i>TOLLIP</i> rs5743890
<i>CALR</i>	<i>EZH2</i>	<i>JAK3</i>	<i>PML</i>	<i>SFTPA2</i>	<i>TOLLIP</i> rs5743894
<i>CBL</i>	<i>FANCA</i>	<i>KDM6A</i>	<i>POT1</i>	<i>SFTPB</i>	<i>TP53</i>
<i>CBLB</i>	<i>FANCB</i>	<i>KIT</i>	<i>PRF1</i>	<i>SFTPC</i>	<i>TPP1</i>
<i>CBLC</i>	<i>FANCC</i>	<i>KMT2A</i>	<i>PTEN</i>	<i>SH2B3</i>	<i>U2AF1</i>
<i>CCT2</i>	<i>FANCD2</i>	<i>KRAS</i>	<i>PTGES3</i>	<i>SHQ1</i>	<i>U2AF2</i>
<i>CCT3</i>	<i>FANCE</i>	<i>LIG4</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SLX4</i>	<i>USB1</i>
<i>CCT4</i>	<i>FANCF</i>	<i>MPL</i>	<i>RAD21</i>	<i>SMC1A</i>	<i>WAS</i>
<i>CCT5</i>	<i>FANCG</i>	<i>MRE11A</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SMC3</i>	<i>WRAP53</i>
<i>CCT6A</i>	<i>FANCI</i>	<i>MUC5B</i>	<i>RPL11</i>	<i>SRP72</i>	<i>WRN</i>
<i>CCT7</i>	<i>FANCL</i>	<i>MYC</i>	<i>RPL15</i>	<i>SRSF2</i>	<i>WT1</i>
<i>CCT8</i>	<i>FANCM</i>	<i>MYD88</i>	<i>RPL35A</i>	<i>STAG2</i>	<i>ZBTB48</i>
<i>CDAN1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>NAF1</i>	<i>RPL5</i>	<i>STAT3</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>FLT3</i>	<i>NBN</i>	<i>RPS10</i>	<i>TCP1</i>	-
<i>CEBPA</i>	<i>G6PC3</i>	<i>NHP2</i>	<i>RPS17</i>	<i>TEN1</i>	-
<i>CSF3R</i>	<i>GATA1</i>	<i>NOP10</i>	<i>RPS19</i>	<i>TERC</i>	-
<i>CTC1</i>	<i>GATA2</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>RPS24</i>	<i>TERF1</i>	-

Para informações a respeito de cada gene, acesse o Genome Aggregation Database (GnomAD).

O DNA genômico total de cada paciente (50 ng) foi fragmentado enzimaticamente em sequências de cerca de 300 pares de bases. Adaptadores foram adicionados às extremidades dos fragmentos, que foram purificados com *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP Beads* (Beckman Coulter – Brea, Califórnia, EUA). O DNA fragmentado foi hibridado com a biblioteca de captura alvo-específica contendo sondas para os genes do painel (Quadro 3). As moléculas hibridadas foram capturadas e amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), com a finalidade de enriquecer os fragmentos da biblioteca gerada. Por fim, uma sequência específica (*barcode* ou índice) foi adicionada aos fragmentos amplificados de cada paciente, servindo como identificador único. Cada biblioteca foi quantificada por fluorimetria e qualificada por eletroforese automatizada. A qualificação e a quantificação precisa das bibliotecas garantem o melhor aproveitamento da lâmina de sequenciamento e, conseqüentemente, a geração da maior quantidade de dados com a melhor qualidade possível.

3.6.1.2 Sequenciamento

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma *NextSeq* (Illumina – San Diego, Califórnia, EUA) pelos métodos de “*Bridge PCR*” e “*SBS*” (*Sequencing-by-Synthesis*) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o *NextSeq 500/550 High Output Kit v2* para 300 ciclos (Illumina – San Diego, Califórnia, EUA).

3.6.1.3 Associação de variantes

Os arquivos do tipo “fastq” gerados no sequenciador foram inicialmente analisados pelo *software NextSeq Reporter* (Illumina – San Diego, Califórnia, EUA), que avalia os escores de qualidade de cada base capturada durante o sequenciamento (Q-scores) e remove os dados de baixa qualidade (Q-scores < 30). Em seguida, o programa *SureCall* (Agilent – Santa Clara, Califórnia, EUA) foi utilizado no alinhamento e mapeamento dos fragmentos de sequência (*reads*) com uma sequência de referência (nesse caso, as regiões do genoma humano

correspondentes aos genes enriquecidos nas bibliotecas). As potenciais variantes apontadas pelo *SureCall* foram anotadas utilizando a ferramenta *wANNOVAR* (WANG GENOMICS LAB, 2012-2018; CHANG; WANG, 2012; YANG; WANG, 2015).

3.6.1.4 Seleção das variantes relevantes

Após a anotação, foram selecionadas as variantes novas ou descritas com frequência alélica abaixo de 0,1% na base de dados de sequenciamento de exomas e genomas humanos *GENOME AGGREGATION DATABASE* (GnomAD) (LEK et al., 2016). Em seguida, essas variantes foram filtradas de acordo com seu impacto na proteína, permanecendo aquelas em regiões de éxons que levam a mudanças na matriz de leitura, que levam à mudança do aminoácido (não-sinônimas) e as que geram um códon de parada da tradução (sem sentido). À parte dos éxons, foram consideradas relevantes as variantes em regiões promotoras de genes (como TERT), e em RNAs não codificadores (como TERC). A patogenicidade de cada variante selecionada foi predita *in silico* utilizando a ferramenta *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD), que é um método que integra objetivamente várias anotações em uma única medida (*C scores*) para cada variante genética. Os escores CADD são calculados usando método semelhante ao *PHRED* (KIRCHER et al., 2014). Tal pontuação se correlaciona com a diversidade alélica, dados sobre funcionalidade, patogenicidade, gravidade da doença, efeitos regulatórios medidos experimentalmente e complexas associações de características. O CADD então é uma medida do quão deletéria é uma variante, baseado em várias categorias funcionais, tamanhos de efeito e arquitetura genética (KIRCHER et al., 2014). Conforme sugerido pelo grupo elaborador do sistema de pontuação do CADD, foi assumido um limite da pontuação de 15, acima da qual a variante foi considerada potencialmente patogênica (UNIVERSIDADE DE WASHINGTON, 2013-2014). Alguns polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), ou seja, com frequência alélica acima de 1% na população, são descritos como enriquecidos em pacientes com FPI (KROPSKI; BLACKWELL; LOYD, 2015). Dessa forma, esses SNPs também foram considerados relevantes, quando presentes nos pacientes. As frequências alélicas destes SNPs foram comparadas com as frequências alélicas da população saudável, a nível global,

obtidas por bancos de dados genéticos populacionais: GnomAD e *The 1000 Genomes Project*.

3.6.2. Sequenciamento de Sanger

As variantes encontradas nos pacientes foram validadas pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Fragmentos de PCR purificados foram diretamente sequenciados em ambas as direções. Reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, EUA). A eletroforese capilar foi realizada no aparelho ABI 3500 XL (Applied Biosystems – Foster City, Califórnia, EUA). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software *Sequencher* versão 5 (Gene Code Corporation – Ann Arbor, Michigan, EUA).

3.7. Exames anatomopatológicos

Todos os exames anatomopatológicos disponíveis dos indivíduos estudados foram revistos por um mesmo médico patologista especializado em patologia pulmonar, segundo critérios histomorfológicos estabelecidos pela *American Thoracic Society/European Respiratory Society* e *Pulmonary Pathology Society* (TRAVIS et al., 2013; MILLER et al., 2018).

3.8. Aspectos estatísticos

Devido à distribuição da maioria dos dados encontrados e à natureza essencialmente clínica dos achados, foi feita opção de exibição dos resultados na forma de medianas e extremos de variação. Alguns resultados ainda são exibidos na forma de números absolutos e frequências percentuais.

As frequências alélicas das variantes comuns encontradas foram calculadas conforme descrito abaixo:

$$\text{Frequência alélica} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de heterozigotos} + (2 \times \text{n}^{\circ} \text{ de homozigotos})}{2 \times \text{número de indivíduos da amostra}}$$

A patogenicidade de cada variante genética nova encontrada foi predita *in silico* utilizando a ferramenta CADD, que é um método que integra objetivamente várias anotações em uma única medida (*C scores*). Tal ferramenta foi construída com base em diversas informações e banco de dados previamente gerados, incluindo métodos de medidas de conservação; informações regulatórias; informações de transcrição e classificações a nível de proteínas. Na implementação do CADD, o sistema foi treinado para diferenciar 14,7 milhões de alelos humanos de alta frequência de 14,7 milhões de variantes simuladas. A base deste sistema computacional é capturar correlatos de restrição seletiva, conforme manifestados nas diferenças entre variantes simuladas e alterações observadas derivadas de humanos. A escala de classificação (*C scores*) varia de 1 a 99, baseado na classificação relativa de uma determinada variante comparada com todas as possíveis substituições no genoma humano de referência (KIRCHER et al., 2014).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas

No presente estudo, foram avaliados 35 pacientes casos índice com PIF, sendo três pacientes procedentes do serviço de Pneumologia do IAMSPE e 32 do HCFMRP-USP. De todos os pacientes avaliados, apenas dois eram procedentes do serviço de Hematologia.

As características clínicas destes pacientes podem ser observadas na Tabela 1. Houve um discreto predomínio de indivíduos do sexo feminino (51,4%) em relação aos de sexo masculino. A mediana de idade do grupo no momento da avaliação foi 66 anos, variando entre 35,5 e 89,3 anos. A idade mediana dos pacientes no momento do surgimento de sintomas atribuíveis à doença pulmonar foi 63,2 (34-84) anos. A idade mediana de estabelecimento do diagnóstico da doença pulmonar foi 64 (35,3-85) anos. A história de DIP na família estava presente em parentes de primeiro grau de 34 pacientes avaliados; e em apenas um paciente o familiar acometido era um parente de segundo grau (tio materno).

História de tabagismo foi relatada por 45,7% dos indivíduos, enquanto outras exposições ambientais relevantes foram referidas por 80% dos casos. Deve-se enfatizar que história de exposição a aves esteve presente em 57,1% dos indivíduos.

Tosse e dispneia foram os sintomas mais comuns. Tosse, em algum grau, foi referida por 85,7%, sendo que a expectoração esteve presente em relatos de 65,7% dos indivíduos. Dispneia de grau igual ou maior do que 2 pelo MRCm foi referida por 48,6% dos pacientes. História de sibilância foi pouco frequente (34,3%).

Ainda que 91,4% dos pacientes exibissem ao exame físico estertores finos, baqueteamento digital só foi encontrado em 20%. A mediana da SpO₂ medida em ar ambiente foi 96%, variando entre 70 e 98%. Seis pacientes mostraram valor de SpO₂ igual ou inferior a 90%.

Quatro pacientes (11,4%) mostravam achados clínicos que levantavam suspeitas de telomeropatias: dois com síndrome mielodisplásica e hepatopatia crônica, um apenas com cirrose hepática, e um último com história de cabelos brancos antes dos 25 anos de idade.

Tabela 1 – Características clínicas de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Variáveis	N	%
Sexo		
Masculino	17	48,6
Feminino	18	51,4
Idade na avaliação (anos)	66 (35,5-89,3)	-
Idade no início dos sintomas (anos)	63,2 (34-84)	-
Idade ao diagnóstico (anos)	64 (35,3-85)	-
Grau de parentesco com o acometido		
Primeiro grau	34	97,1
Segundo grau	1	2,9
Tabagismo		
Atual	2	5,7
Passado	14	40
Nunca fumou	19	54,3
Exposição ambiental atual ou pregressa		
Ausente	7	20
Aves	20	57,1
Mofo	8	22,9
Dispneia		
MRCm		
0	6	17,1
1	12	34,3
2	6	17,1
3	4	11,5
4	7	20
Tosse	30	85,7
Expectoração	23	65,7
Sibilância	12	34,3
Estertores finos	32	91,4
Baqueteamento digital	7	20
SpO2 (%)	96 (70-98)	

* Dados disponíveis para 31 pacientes. ** Dados disponíveis para 30 pacientes.
Idade e Saturação de O₂ expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo encontrados).

4.2. Características funcionais

A avaliação funcional completa pela espirometria, incluindo medidas de CPT e DCO foi obtida de 28 pacientes. Dos pacientes que não conseguiram a avaliação completa, dois não tinham nenhuma das duas medidas, dois apresentaram resultados de DCO, porém não tinham medidas de CPT e três apresentaram medidas de CPT, mas não tinham realizado medidas de DCO. Tal problema ocorreu devido ao fato de que tais pacientes compareceram apenas em uma única avaliação pontual, trazendo seus exames realizados no serviço em que faziam seguimento previamente, e que não quiseram retornar para a realização de novos exames no nosso centro.

Os valores medianos e extremos de variação da CPT, CVF, VEF₁, VEF₁/CVF e DCO foram, respectivamente, 68(41,3-102,4)% do previsto, 64,9(48,8-105,7)% do previsto, 69,3(49,1-117,9)% do previsto, 108,5(84,0-124)% do previsto e 38,9(16,7-60)% do previsto (Tabela 2).

Tabela 2 – Função pulmonar de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

	% do previsto
CPT *	68 (41,3-102,4)
CVF	64,9 (48,8-105,7)
VEF1	69,3 (49,1-117,9)
VEF1/CVF	108,5 (84-124)
Dco**	38,9 (16,7-59,9)

* Dados disponíveis para 31 pacientes. ** Dados disponíveis para 30 pacientes.
Medidas expressas em mediana (valor mínimo – valor máximo encontrados).

Fluxos aéreos supranormais, definidos por relações VEF₁/CVF superiores a 105% do previsto, estiveram presentes em 77,1% dos voluntários. Dos 35 pacientes avaliados, os padrões dos distúrbios ventilatórios puderam ser classificados como restritivos em 20 (57,1%), normais em 10 (28,6%), inespecíficos em 4 (11,4%) e obstrutivo leve em 1 (2,9%). Os valores de DCO mostraram-se reduzidos em todos os 30 pacientes em que foi possível pesquisá-lo (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da função pulmonar de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar classificados em categorias

	N	%
CPT * (% do previsto)		
≥ 80%	12	38,7
60-79%	9	29
40-59%	10	32,3
< 40%	0	0
CVF (% do previsto)		
≥ 80%	8	22,9
60-79%	14	40
40-59%	13	37,1
< 40%	0	0
VEF₁ (% do previsto)		
≥ 80%	11	31,4
60-79%	19	54,3
40-59%	5	14,3
< 40%	0	0
VEF₁/CVF (% do previsto)		
≥ 110%	16	45,7
100-109%	14	40
90-99%	4	11,4
80-89%	1	2,9
≤ 79%	0	0
Dco** (% do previsto)		
≥ 80%	0	0
60-79%	0	0
40-59%	13	43,3
< 40%	17	56,7

* Dados disponíveis para 31 pacientes. ** Dados disponíveis para 30 pacientes.

4.3. Avaliação radiológica

Do ponto de vista tomográfico, padrão típico de PIU foi detectado em 6 (17,1%) pacientes e padrão indeterminado para PIU em outros 4 (11,4%). A maioria dos casos, 25 (71,4%), exibiu padrão tomográfico inconsistente com PIU. Desses últimos casos, 11 (31,4%) exibiam padrão de doença intersticial sem padrão característico, ou seja, não passíveis de classificação dentro de padrões radiológicos previamente descritos de pneumopatias intersticiais. Dos demais, 9 (25,7%) puderam ser classificados como portadores de TCAR compatíveis com PINE, 3 (8,6%) como PO e 2 (5,7%) como PH crônica (Tabela 4, Figura 3).

Em cinco pacientes cuja alteração tomográfica foi “Inconsistente com PIU, sem padrão característico”, houve divergência nas análises quanto ao subtipo de padrão radiológico. Em um caso, a dúvida ficou entre PH e “sem padrão característico”; em outro caso entre PID, PH e PINE e em dois casos, entre PH e PINE.

Tabela 4 – Padrões tomográficos de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

	N	%
Compatível com PIU	6	17,1
Possível PIU	4	11,4
Provável PIU	0	0
Indeterminado	4	11,4
Inconsistente com PIU	25	71,4
PINE	9	25,7
PH	2	5,7
PO	3	8,6
Sem padrão característico	11	31,4

Figura 3 – Padrões tomográficos observados em três pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Imagens axiais de tomografia computadorizada de alta resolução, janela pulmonar, representativas de pacientes com Pneumonia Intersticial Familiar. A. Paciente com padrão compatível com PIU. B. Paciente com padrão de possível PIU (padrão indeterminado). C. Paciente com padrão inconsistente com PIU, compatível com PINE.

4.4. Achados anatomopatológicos

Tecido pulmonar foi obtido para minuciosa revisão anatomopatológica de seis casos, um proveniente de autópsia e os demais, de biópsias cirúrgicas (Tabela 5). O material de autópsia revelava dano alveolar difuso e pneumonia organizante em vários estágios de organização. Um caso mostrou padrão de pneumonite intersticial celular e fibrosante não classificável, com múltiplos agregados linfóides (Figura 4A). Os demais quatro mostraram padrões de pneumonite intersticial com acentuação bronquiocêntrica, em três deles com destacadas áreas de bronquiolite proliferativa (Figura 4B). Todos esses quatro casos relatavam história de exposição a pássaros e, após discussão multidisciplinar, foram diagnosticados como PH.

Tabela 5 – Padrões anatomopatológicos de seis pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Paciente	Espécime	Achados
1	Necropsia	Dano alveolar difuso em progressão para pneumonia organizante em vários estágios de organização
4	Toracotomia limitada	Pneumonite intersticial crônica celular e fibrosante com acentuação bronquiocêntrica associado a bronquiolite proliferativa
14	Toracotomia limitada	Fibrose pulmonar centrada nas vias aéreas
21	Videotoracoscopia	Pneumonite intersticial crônica celular e fibrosante com acentuação bronquiocêntrica associado a bronquiolite proliferativa
31	Videotoracoscopia	Pneumonia Intersticial crônica celular e fibrosante com acentuação bronquiocêntrica associada a bronquiolite proliferativa
34	Videotoracoscopia	Pneumonite intersticial celular e fibrosante não classificável com múltiplos agregados linfóides

Fonte: Espécimes analisados e revisados por Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro. Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

Figura 4 – Aspectos histopatológicos de dois pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

A – Padrão “Inclassificável”. Note a difusa distorção arquitetural fibroplásica com formações de cistificações associada a agregados linfóides. B – Padrão “acentuação bronquiocêntrica”. Note o predominante acometimento fibroplásico peribronquiolar com extensão subpleural “em delta”, associada a pneumonia organizante. Ressalta-se o septo interlobular e o restante da pleura de aspecto habitual (HE 20X).

Fonte: Imagens fornecidas por Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro. Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP.

4.5. Análise do comprimento telomérico

Constatou-se a presença de encurtamento telomérico, comprimento abaixo de P10 para a idade, em cinco pacientes casos índice de PIF. Apenas um desses indivíduos apresentava comprimento telomérico muito curto para a idade, ou seja, abaixo de P1.

Vale ressaltar que apesar de apenas uma pequena porcentagem da amostra (14,3%) apresentar encurtamento telomérico, 30 indivíduos (85,7%) exibiram comprimentos teloméricos abaixo do P50 para a idade (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Comprimentos teloméricos de glóbulos brancos de sangue periférico de 35 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar determinados pelo método de *Southern blot*

Os comprimentos teloméricos de 35 pacientes com Pneumonia Intersticial Familiar estão representados pelos pontos vermelhos no gráfico de percentis determinados a partir de controles. O grupo controle foi constituído por 302 indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias. As linhas representam os percentis de 99%, 90%, 50%, 10% e 1% do comprimento telomérico desses controles saudáveis.

4.6. Avaliação genética

A análise do NGS pôde identificar variantes genéticas comuns nos genes TERT, TOLLIP e MUC5B, conforme exposto na Tabela 6.

Tais variantes ocorreram em 30 pacientes (90,9%). Diferentes combinações destes polimorfismos, variando de dois a cinco por indivíduo, puderam ser observadas em 72,7% dos pacientes avaliados.

Tabela 6 – Variantes genéticas comuns encontradas em 33 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Gene	Polimorfismo	N	%	Expressão
MUC5B	<i>rs35705950</i> (g.1219991G>T)	23	69,7	Homozigose: 4 Heterozigose: 19
TOLLIP	<i>rs111521887</i> (g.1291476C>G)	17	51,5	Homozigose: 0 Heterozigose: 17
	<i>rs5743894</i> (g.1303542T>C)	17	51,5	Homozigose: 0 Heterozigose: 17
	<i>rs5743890</i> (g.1304599T>C)	8	24,2	Homozigose: 0 Heterozigose: 8
TERT	<i>rs2736100</i> (g.1286401C>A)	21	63,6	Homozigose: 6 Heterozigose: 15

As posições do DNA são descritas usando as seguintes isoformas: MUC5B e TOLLIP (NC_000011.10); TERT (NM_198253.2 e NC_000005.10).

As frequências alélicas destas variantes encontradas nesta amostra podem ser observadas no Gráfico 2, assim como suas respectivas frequências nos principais bancos de dados consultados, *The 1000 Genomes Project* e GnomAD.

Gráfico 2 – Frequências alélicas das variantes comuns nos 33 pacientes casos índices de Pneumonia Intersticial Familiar e nos bancos de dados populacionais do genoma humano

Fonte: The 1000 Genomes Project, 2015; Genome Aggregation Database, 2016.

Foram ainda encontradas sete variantes genéticas raras em quatro genes diferentes, conforme demonstrado na Tabela 7. Constatou-se a coexistência das variantes genéticas comuns acima descritas em cinco destes indivíduos.

Tabela 7 – Variantes genéticas raras encontradas em 33 pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Gene	Alteração	N	%	Expressão
TERT	<i>c.2594G>A</i>	1	3,1	Heterozigose
	<i>c.1730G>A</i>	1	3,1	Heterozigose
	<i>c.2146G>A</i>	1	3,1	Heterozigose
RTEL1	<i>c.394C>T</i>	1	3,1	Heterozigose
	<i>c.2299C>T</i>	1	3,1	Heterozigose
SHQ1	<i>c.828_831del</i>	1	3,1	Heterozigose
WRAP53	<i>c.1558dupG</i>	1	3,1	Homozigose

As posições do DNA são descritas usando as seguintes isoformas: TERT (NM_198253.2 e NC_000005.10); RTEL1 (NM_032957.4); SHQ1 (NM_018130) e WRAP53 (NM_018081).

Das variantes genéticas raras, duas ainda não haviam sido descritas na literatura: uma em TERT (c.1730G>A) e uma em RTEL1 (c.2299C>T). Outras duas variantes nos genes de SHQ1 e de WRAP53 já haviam sido descritas, porém não foram ainda associadas a doenças pulmonares: SHQ1 (c.828_831del) e WRAP53 (c.1558dupG) (GnomAD; Database of Single Nucleotide Polymorphisms – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). As descrições dessas mutações, bem como as características clínicas, funcionais, radiológicas e comprimento telomérico dos pacientes em que elas foram encontradas estão expostas na Tabela 8.

Tabela 8 – Características clínicas e comprimento telomérico em quatro pacientes casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar com as novas variantes genéticas raras descobertas em associação com a doença

	TERT	RTEL1	SHQ1	WRAP53
Alteração DNA	c.1730G>A	c.2299C>T	c.828_831del (het)	c.1558dupG (homo)
Alteração proteína	p.R577Q	p.R767X	p.D277Sfs*25	p.A522Gfs*7
Sexo	F	F	M	F
Idade no início dos sintomas	75,8	48,5	52,5	84
Idade ao diagnóstico	76,5	50,5	55,2	85
Tabagismo	Não	Não	Sim	Não
CVF (% pred)	63,6	59,7	58,1	104,9
DLCO (% pred)	34,6	36,9	19,6	55,3
Padrão tomográfico	Inconsistente com PIU. PINE.	Compatível com PIU.	Compatível com PIU.	Inconsistente com PIU. PINE.
CT	Curto (entre P1-10)	Normal (entre P10-P50)	Normal (entre P10-P50)	Normal (entre P50-P90)

Het: Heterozigoto; Homo: homozigoto; CT: comprimento telomérico.

As variantes descritas na tabela nos genes TERT e RTEL1 ainda não foram descritas nos bancos de dados utilizados (GnomAD; dbSNP-NCBI). As variantes nos genes SHQ1 e WRAP53 já foram descritas, porém ainda não foram descritas na literatura em associação com doença pulmonar fibrosante

As novas variantes raras descobertas foram consideradas potencialmente patogênicas após cálculo dos seus respectivos escores CADD, sendo 33 para a nova variante em TERT e 39 para a nova variante em RTEL1.

Para melhor avaliar a patogenicidade das novas variantes raras encontradas, foram convocados os familiares dos casos índice de PIF nos quais identificamos tais mutações (TERT (c.1730G>A) e RTEL1 (c.2299C>T)), para avaliação clínica e genética, a fim de se analisar a segregação nas famílias.

As famílias estudadas são expostas nos heredogramas caracterizados nas figuras 5 e 6.

Figura 5 – Heredograma da família do caso índice de Pneumonia Intersticial Familiar com a variante genética rara descoberta no gene TERT

Os indivíduos do sexo feminino estão representados pelos círculos e do sexo masculino pelos quadrados. Os indivíduos afetados por doença pulmonar intersticial estão representados pelos dois quadrantes laterais direitos preenchidos pela cor preta. Os indivíduos que não foram analisados geneticamente estão com ponto de interrogação em seu interior. Os indivíduos já falecidos foram representados por um traço sobre a forma representada. O caso índice é indicado pelo asterisco vermelho. Aqueles que apresentaram a mutação foram assinalados com o escrito TERT. CT: comprimento telomérico. Observa-se que a paciente caso índice e a filha que apresenta evidências de doença pulmonar possuem comprimento telomérico abaixo de P10.

Na família cujo caso índice apresentou a nova variante rara em TERT, havia história de doença pulmonar fibrosante, comprovada por exames radiológicos, em dois irmãos já falecidos da paciente caso índice. Nesta família, foi possível avaliar as três filhas da paciente e comprovar a presença da variante genética em todas elas. No entanto, em apenas uma filha houve encurtamento telomérico e comprometimento pulmonar por doença intersticial incipiente (Figura 5).

Figura 6 – Heredograma da família do caso índice de Pneumonia Intersticial Familiar com a variante genética rara descoberta no gene RTEL1

Os indivíduos do sexo feminino estão representados pelos círculos e do sexo masculino pelos quadrados. Os indivíduos afetados por doença pulmonar intersticial estão representados pelos dois quadrantes laterais direitos preenchidos pela cor preta. Os indivíduos que não foram analisados geneticamente estão com ponto de interrogação em seu interior. Os indivíduos já falecidos foram representados por um traço sobre a forma representada. O caso índice é indicado pelo asterisco vermelho. Aqueles que apresentaram a mutação foram assinalados com o escrito RTEL1. CT: comprimento telomérico. Observa-se que o caso índice teve comprimento telomérico entre P10 e P20. Dois irmãos e o filho da paciente caso índice que apresentaram a mutação tiveram comprimentos teloméricos próximos a P10.

Já na família cujo caso índice apresenta a nova variante rara em RTEL1, havia história de doença pulmonar fibrosante do pai e de três irmãos da paciente. O pai e um dos irmãos já haviam falecido muitos anos antes do início dos sintomas da paciente caso índice. Os outros dois irmãos acometidos vieram a falecer durante o andamento do presente estudo, sendo possível a análise genética de apenas um deles. Além dele, foi possível avaliar mais três irmãos da paciente caso índice, seus dois filhos e mais cinco sobrinhos. Todos os irmãos avaliados apresentaram evidência de DIP na análise tomográfica. Nenhum dos filhos ou sobrinhos eram acometidos. Dois irmãos, um filho e dois sobrinhos eram portadores da variante rara em questão. Nesses indivíduos, o comprimento telomérico estava no limite da normalidade (P10) em dois irmãos e no filho da paciente; nos demais, inclusive na paciente caso índice, não houve evidência de encurtamento telomérico.

Para os indivíduos casos índice com variantes raras descritas nos genes SHQ1 e WRAP53 não foi possível análise de segregação familiar, devido indisponibilidade dos demais familiares até o momento da confecção deste trabalho.

Não foram encontradas variantes genéticas nos genes estudados relacionados às proteínas do surfactante (ABCA3, SFTPA1, SFTAP2, SFTPB, SFTPC).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve as características clínicas, radiológicas, anatomopatológicas e genéticas da primeira série de casos índice de pacientes com PIF investigada no Brasil. Do observado, o elemento principal que sobressai é a grande variedade das formas de apresentação clínica e radiológica exibidas pela moléstia, que é equiparável às diversas combinações de diferentes variantes genéticas encontradas nestes indivíduos.

Do ponto de vista sintomatológico, ainda que as manifestações clínicas iniciais atribuíveis à doença tenham surgido entre 50 e 69 anos em 65,7% dos casos, elas puderam aparecer em idades tão extremas quanto 34 e 84 anos. Como consequência, 14,3% dos diagnósticos foram realizados em idades inferiores a 50 anos e 5,7% deles, em idades superiores a 80 anos. Certamente que, para um clínico atento, a presença de PIF em paciente com idade inferior a 50 anos chama a atenção para a possibilidade de doença familiar (BORIE et al., 2015; GARCÍA-SANCHO et al., 2011). Contudo o mesmo, normalmente, não acontece quando se trata de indivíduos com idade mais avançada, particularmente depois dos 80 anos. Portanto, os resultados atuais apontam para a necessidade da pesquisa minuciosa da presença de outras pneumonites intersticiais em familiares, independentemente da idade do surgimento dos sintomas ou do estabelecimento do diagnóstico do doente investigado.

Como o esperado, em se tratando de quadros intersticiais pulmonares, dispneia e tosse seca foram as queixas clínicas mais comuns presentes, respectivamente, em 82,9% e 85,7% dos pacientes (CORDIER, COTTIN, 2013). Uma limitação funcional importante também foi observada nestes indivíduos, que reportaram dispneia de grau igual ou maior do que 2 pelo MRCm em 48,6% dos casos.

Quanto à pesquisa de antecedentes, 45,7% referiram história de tabagismo atual ou pregresso, enquanto 80% dos acometidos reportaram exposição, atual ou antiga, a ambientes com bolor ou aves. Este achado corrobora com a hipótese defendida por diferentes autores, segundo a qual, complexas interações entre alterações genéticas e fatores ambientais favorecem um microambiente intracelular e intersticial modulador de vias moleculares dependentes de SNPs, *splicing*

alternativos, pequenos RNAs, atividade enzimática e mecanismos epigenéticos para a ativação de um perfil fibroplásico que determinará o desenvolvimento da doença (KAUR; MATHAI; SCHWARTZ, 2017; KROPSKI; BLACKWELL; LOYD, 2015; SPAGNOLO; GRUNEWALD; DU BOIS, 2014). E ainda, é digna de nota a elevadíssima prevalência de fatores de risco para PH em pacientes brasileiros. Naturalmente que o último achado pode ser apenas reflexo de a amostra atual ser constituída quase que exclusivamente (91,4%) por pacientes moradores em cidades do interior paulista. Em pacientes com PIF, moradores em aglomerados urbanos maiores, a exposição a aves e animais talvez seja menos comum; no entanto, é possível que também tenham um maior contato com mofo, presente em construções e em aparelhos de ar condicionado.

Na casuística atual, outro caso de PIF foi identificado em pelo menos um parente de primeiro grau (pai, mãe ou irmão) em 97,1% dos indivíduos. Em apenas uma situação, o parente mais próximo afetado foi um tio materno. Esse tipo de constatação reforça o significado dos resultados agora encontrados.

Em relação às alterações observadas no exame físico, estertores finos foram detectados na ausculta de 91,4% dos indivíduos, apontando para a importância da pesquisa desse achado, na suspeita de PIF de qualquer natureza (COTTIN, RICHEL, 2014; BADDINI-MARTINEZ et al., 2013).

Funcionalmente, a maioria dos pacientes exibiram padrões compatíveis com distúrbios restritivos, o que era esperado diante da natureza das pneumopatias em investigação. O único paciente que mostrou distúrbio obstrutivo, classificado como de grau leve, exibia tabagismo passado de 50 anos-maço. Muito relevante, os valores da DCO mostraram-se substancialmente reduzidos em todos os pacientes nos quais o teste foi obtido, ressaltando a grande sensibilidade diagnóstica desse exame em pacientes com PIF (SØRENSEN; ROSSING; RØRTH, 1985). A importância da pesquisa da DCO em pacientes com quadros de PIF fica mais evidente, quando foi constatado que todos os nove pacientes com espirometrias normais, e que completaram aquele teste, mostraram valores de difusão alterados.

Na presente casuística, padrão tomográfico típico de PIU foi encontrado em apenas seis (17,1%) casos. A grande maioria dos pacientes (25=71,4%) exibiu padrões inconsistentes com PIU. A análise deste último grupo permitiu a determinação de padrões tomográficos específicos em apenas 14 (40%). Portanto,

chama a atenção o grande número de acometidos por PIF (11=31,4%) com tomografias sem padrões característicos.

Ainda que Steele et al. (2005) tenham reportado uma frequência elevada de padrões tomográficos compatíveis com PIU na PIF, os resultados atuais mostram grande similaridade com o encontrado em outro estudo envolvendo casuística numerosa, onde 160 (55%) de 289 acometidos por PIF exibiram padrões tomográficos não classificáveis (LEE et al., 2012). Neste último estudo, a investigação foi realizada por especialistas de renome, envolvendo também uma revisão mais rigorosa daqueles dados previamente publicados. As frequências dos padrões encontrados naquele estudo, também detectados na presente investigação, foram: PIU=22%, PINE=12%, PH=6% e PO=2%. Assim, os resultados atuais apontam na mesma direção de evidências prévias que indicam que o padrão típico de PIU aparece apenas em uma minoria de pacientes acometidos por PIF. Apesar de padrões de PINE serem evidenciados em número expressivo de pacientes, o mais comum é a detecção de padrões tomográficos não classificáveis.

Pode-se argumentar que os padrões não classificáveis representem doença inicial e possam evoluir posteriormente para padrões mais específicos, particularmente PIU. Uma resposta definitiva sobre essa possibilidade só será fornecida com o desenvolvimento de estudos longitudinais bem desenhados. Porém, na investigação atual, TCAR sem padrões característicos foram observadas até em pacientes com idade avançada. Além disso, um estudo que avaliou exames de 26 pacientes com PIF em duas ocasiões, separados por tempo mediano de 1049 dias, encontrou que apenas padrões iniciais de possível PIU progrediram para imagens típicas de PIU (BENNETT et al., 2017). Portanto, embora o significado atual dos padrões tomográficos não classificáveis da PIF não seja perfeitamente compreendido, ao que tudo indica, eles não correspondem, obrigatoriamente, a PIU em fase inicial.

Tecido pulmonar foi disponível para revisão em apenas seis ocasiões. No material de autópsia, o padrão encontrado foi “dano alveolar difuso e áreas de pneumonia organizante em diferentes graus de evolução”. Ao que tudo indica, esses achados representam eventos terminais, relacionados com episódio de exacerbação aguda fatal, ou ainda com possível quadro infeccioso sistêmico, ou à ventilação mecânica prolongada (CHURG; WRIGHT; TAZELAAR, 2011). Informações mais relevantes foram fornecidas por cinco biópsias cirúrgicas eletivas. Tais biópsias não

foram obtidas de maneira sistematizada e as indicações para sua realização foram influenciadas pela prática assistencial dos médicos responsáveis pelo cuidado desses pacientes.

Em um caso, o diagnóstico foi “pneumonite intersticial celular e fibrosante não classificável”, achado que não causa surpresa, pois estudo anterior descreveu essa anormalidade em 43,3% das biópsias de acometidos por PIF (LESLIE et al., 2012). Em tal estudo, padrão PIU só foi adequadamente definido em 40% das biópsias. Para esses autores, mesmo que a maioria das biópsias dos pacientes com PIF exibam características histopatológicas individuais comumente encontradas na PIU, elas, frequentemente, não se encaixam perfeitamente nas definições atuais desse padrão.

O padrão mais encontrado nas biópsias da investigação atual foi a pneumonite intersticial com acentuação bronquiocêntrica, em três delas com áreas de bronquiolite proliferativa associadas. Desses casos, dois relatavam exposição atual a pássaros; um, exposição atual a pássaros e travesseiro de penas de ganso; e um quarto, exposição a pássaros no passado. Em dois casos, os padrões tomográficos eram compatíveis com PH e nos outros dois, os padrões eram compatíveis com PINE. Ainda que a interpretação de achados de pneumonite intersticial com acentuação bronquiocêntrica possa ser um desafio, em discussão multidisciplinar três casos foram diagnosticados como PH, enquanto um quarto foi classificado como provável PH, pois este indivíduo também exibia história de ter trabalhado com vulcanização de pneus (KURANISHI et al., 2015; SANTOS; FABRO; BADDINI-MARTINEZ, 2018).

A interpretação de diagnósticos de PH num contexto familiar pode tornar-se problemática, caso seja levantado o argumento que eles refletiriam apenas exposições simultâneas a antígenos, em indivíduos convivendo num mesmo ambiente. Contudo, mesmo nesse contexto, entre diversas pessoas expostas, apenas algumas acabam por desenvolver a doença. Desse modo, se dois ou mais familiares desenvolvem PH quando expostos a uma mesma situação ambiental, deve-se supor que eles compartilhem alguma predisposição genética para o estabelecimento do quadro. A revisão das informações disponíveis dos familiares dos quatro pacientes que exibiam pneumonite intersticial com acentuação bronquiocêntrica não sugeriu que se tratava de acometimentos simultâneos de PH.

Neste estudo, observou-se que a heterogeneidade da PIF se apresenta também a nível molecular. O resultado da complexa interação entre os fatores ambientais e as variantes genéticas de diferentes impactos encontradas nesta amostra corrobora com as diferentes apresentações clínicas da doença.

Diversas combinações de variantes genéticas comuns e raras puderam ser observadas. Comprovou-se a presença enriquecida das principais variantes comuns já descritas em associação com PIF e FPI em 90,9% dos indivíduos estudados.

O polimorfismo no promotor do gene MUC5B (rs35705950) foi a variante genética mais frequente, sendo constatada em 69,7% dos indivíduos estudados, com uma frequência alélica de 41%. Tal SNP foi descrito pela primeira vez por Seibold et al. (2011) em um estudo de associação genética com PIF e FPI esporádica. Na região do promotor do gene MUC5B, uma região altamente conservada, ocorre uma troca de Guanina por Timina. O MUC5B codifica a Mucina 5B, um componente macromolecular glicosilado do muco secretado pelas células epiteliais das vias aéreas. Evidências também sugerem que possua uma importante função na imunidade inata (ROY et al., 2014). No estudo de Seibold et al. (2011), o polimorfismo rs35705950 foi associado com uma maior expressão do gene MUC5B no tecido pulmonar saudável e no tecido pulmonar fibrótico, do que nos controles não afetados, independente do genótipo. Naquele estudo, o *odds ratio* (OR) para os heterozigotos e para os homozigotos do alelo desta variante foram, respectivamente, 6,8 (intervalo de confiança 95%: 3,9 a 12) e 20,8 (intervalo de confiança 95%: 3,8 a 113,7), para presença de PIF (teste de associação genotípica, $p = 3,7 \times 10^{-12}$).

A associação entre essa variante e PIF/FPI já foi confirmada em diferentes coortes (BORIE et al., 2013; FINGERLIN et al., 2013; HORIMASU et al., 2015; NOTH et al., 2013; STOCK et al., 2013; WEI et al., 2014; ZHANG et al., 2011). Em uma coorte mexicana, a variante foi um fator de risco para FPI, mas foi rara em uma coorte coreana (PELJTO et al., 2015). Apesar da frequência alélica desta variante ser baixa entre os asiáticos, em estudos de japoneses e chineses, foi observada uma maior frequência da variante em indivíduos com FPI do que em indivíduos controles (HORIMASU et al., 2015; WANG et al., 2014). Apesar disso, em populações africanas, onde se estima ser rara a fibrose pulmonar, o polimorfismo no promotor do MUC5B não esteve presente (dbSNP - NCBI). O presente trabalho, neste aspecto, traz informações importantes, considerando-se as particularidades da população brasileira, que é marcada pela miscigenação. Ainda que seja uma

pequena coorte de pacientes com PIF, indica a possibilidade de que tal variante genética seja um importante fator de risco para a doença também na população brasileira. Estudos maiores, controlados, multicêntricos, pelo país são necessários para melhor avaliação dessa associação.

No contexto da doença, o aumento da expressão do gene MUC5B no tecido pulmonar e a consequente alteração das características do muco secretado poderiam levar a um prejuízo no *clearance* de toxinas e microorganismos inalados (MORRIS; GIBSON; COLLMAN, 2014). Este possível papel do MUC5B na patogênese da fibrose pulmonar seria particularmente relevante no presente estudo, tendo em vista que a exposição ambiental nos indivíduos estudados foi considerável. Dessa forma, os achados deste estudo reforçam a hipótese de que o aumento da expressão do gene MUC5B no tecido pulmonar e as consequentes alterações das características do muco, que ocorrem pela presença da variante rs35705950, poderiam ocasionar um maior contato do epitélio pulmonar com as toxinas e antígenos inalados (no atual estudo, seria a fumaça do cigarro e os antígenos das aves). Isso levaria a uma maior lesão deste epitélio e a um estímulo prolongado para a ativação inflamatória, contribuindo para a lesão fibrótica pulmonar. Ley et al. (2017) observaram aumento da prevalência do polimorfismo de MUC5B em coortes de pacientes com PH crônica, quando comparados com a população saudável. Tais achados são concordantes com as observações do presente estudo. Além disso, o MUC5B em excesso pode dificultar os mecanismos de reparo alveolar por interferir nas interações entre as células epiteliais e a matriz extracelular, por alterar as propriedades do surfactante e promover o colapso alveolar (MACNEAL; SCHWARTZ, 2012; SEIBOLD et al., 2013). Enquanto o aumento na expressão do MUC5B está associado com a fibrose pulmonar, carreadores deste alelo exibem progressão da doença mais lenta do que os não carreadores, sugerindo que o MUC5B pode ser benéfico em pelo menos uma parcela dos pacientes (SEIBOLD et al., 2011; YANG et al., 2015). Neste cenário, especulações sugerem que o MUC5B poderia inativar estímulos fibrogênicos ainda não conhecidos ou agir como um “surfactante” em pacientes com fibrose com falta do surfactante, reduzindo assim, o colapso alveolar (KOLB; WHITE; GAULDIE, 2016). E ainda, que possa ter um papel biológico benéfico em alguma fase da vida, levando à seleção positiva em uma parcela importante da população (MATHAI et al., 2016).

A variante rs35705950 do promotor do gene MUC5B é um dos raros exemplos de variante comum com grande tamanho de efeito, contribuindo para um aumento importante no risco de desenvolver PIF/FPI. Devido à sua frequência na população geral, sugere-se que a variante possa não ser suficiente para causar uma doença tão rara quanto a PIF, apesar do risco significativo que ela confere (MATHAI et al., 2016). Então, é possível que a participação de interações importantes com outros genes ou com fatores ambientais seja crítica para o desenvolvimento da fibrose (MATHAI et al., 2016). Os achados do atual estudo descritos até agora reforçam esta hipótese.

Apesar de a amostra, no atual estudo, ter um número limitado de pacientes, não foi observada maior ocorrência de padrões tomográficos compatíveis com PIU, como era de se esperar em uma amostra enriquecida com o genótipo rs357057950, que foi associado com uma maior probabilidade de padrão radiográfico de PIU, quando avaliados casos de PII fibróticas (CHUNG et al., 2016). No entanto, quando comparados os indivíduos do presente estudo com padrão tomográfico compatível com PIU, aos indivíduos com padrão inconsistente com PIU, observamos maior frequência alélica desta variante no primeiro grupo (50% *versus* 39,1%). Como a amostra é pequena, tais interpretações ficam limitadas, mas podem refletir uma maior associação entre o polimorfismo de MUC5B e o padrão tomográfico compatível com PIU.

Dados recentes demonstraram que a variante MUC5B rs357057950 esteve associada com evidências radiológicas de anormalidades pulmonares intersticiais em uma coorte em *Framingham* (HUNNINGHAKE et al., 2013). É notável que tais anormalidades radiológicas progridem ao longo do tempo e têm sido ligadas a aumento da mortalidade, especialmente por causas respiratórias (ARAKI et al., 2016; PUTMAN et al., 2016). Essas associações são intrigantes, pois sugerem que variantes comuns, como talvez o polimorfismo em MUC5B, poderiam no futuro ser usadas sozinhas, ou em conjunto com outros dados clínicos e demográficos para triagem, diagnóstico e intervenção precoce no contexto das DIP fibrosantes, principalmente na abordagem de familiares assintomáticos de pacientes com PIF (ARAKI et al., 2016; HUNNINGHAKE et al., 2013; MATHAI; SCHWARTZ; WARG, 2014; MATHAI et al., 2015; PUTMAN; ROSAS; HUNNINGHAKE, 2014; PUTMAN et al., 2016).

Semelhante ao polimorfismo no promotor do gene MUC5B, outras variantes associadas à doença foram identificadas por estudos de associação genômica, como é o caso das variantes observadas no gene TOLLIP (NOTH et al., 2013). O gene TOLLIP é um importante regulador das respostas da imunidade inata, mediada pelas vias de sinalização dos receptores *Toll-like* e do fator transformador de crescimento β (TGF- β) (BULUT et al., 2001; ZHU et al., 2012). Localiza-se no cromossomo 11, bem próximo ao gene MUC5B. Na presente amostra de casos índice de PIF encontramos frequências alélicas idênticas (26%) para as variantes rs111521887 e rs5743894 do gene TOLLIP, maiores do que as observadas em bancos de dados genéticos de populações saudáveis, 11,4% e 12,3%, para cada uma das variantes, respectivamente (GnomAD). Tais resultados são semelhantes aos observados no estudo de Noth et al. (2013), que avaliou 542 indivíduos com FPI e identificou uma frequência alélica de 29% para essas mesmas duas variantes em TOLLIP, rs111521887 e rs5743894, associadas com o desenvolvimento da doença, com OR de 1,48 (intervalo de confiança 95%: 1,32 a 1,66; $p = 2,2 \times 10^{-12}$) e 1,49 (intervalo de confiança 95%: 1,33 a 1,68; $p = 1,35 \times 10^{-12}$), respectivamente; e ainda, comprovou que estas variantes estão em desequilíbrio de ligação e, por isso, são transmitidas associadamente. Os mesmos autores ainda identificaram a variante rs5743890 do gene TOLLIP em associação com FPI, com frequência alélica de 11% da amostra. Após análises, observou-se que o alelo rs5743890_G em TOLLIP estava associado a reduzida susceptibilidade a FPI (OR de 0,61; intervalo de confiança 95%: 0,52 a 0,71; $p = 3,43 \times 10^{-11}$). Entretanto, os indivíduos portadores deste alelo apresentaram maior mortalidade. No presente estudo, a frequência deste alelo foi de 12%, semelhante àquela encontrada no estudo acima citado, mas também muito próxima à da população geral que foi de 9,9% (GnomAD). A exploração de associações entre o alelo em questão e efeitos no desenvolvimento e evolução da doença não foram possíveis, devido ao número limitado de indivíduos e devido ao desenho do presente estudo.

A variante comum rs2736100 no gene TERT foi encontrada em 63,6% dos indivíduos avaliados neste estudo. Quando a frequência alélica desta amostra, de 41%, é comparada com as das populações controle saudáveis, 48,5% e 52,6%, obtidas a partir dos principais bancos de dados (THE 1000 GENOMES PROJECT; GnomAD), observamos uma reduzida frequência daquela variante na amostra estudada. A ocorrência desta variante já foi associada com FPI, outras PIs e

encurtamento telomérico (FINGERLIN et al., 2013; MUSHIRODA et al., 2008; WEI et al., 2014). Tais informações, associadas aos dados do comprimento telomérico encontrados neste estudo, sugerem um possível papel desta variante comum no desenvolvimento da doença, dado que 88,6% dos indivíduos agora estudados exibiram comprimentos teloméricos em percentis abaixo do esperado para a idade (abaixo do P50). Além disso, analisando-se esse subgrupo de indivíduos com comprimento telomérico abaixo do P50, observa-se frequência alélica de 54% da variante em questão.

Quando avaliadas em conjunto, as variantes comuns estiveram presentes em quase 90% dos indivíduos estudados, muito acima do estimado pelos dados acumulados na literatura. Tais dados sugerem que as variantes genéticas comuns explicam pelo menos um terço do risco de se desenvolver PII familiar ou esporádica (MATHAI et al., 2016). Considerando-se ainda que 88,6% dos indivíduos do presente estudo tiveram exposição a algum fator agressor ambiental (tabagismo, contato com aves ou mofo), pode-se demonstrar a importância da combinação de fatores de risco (genéticos e ambientais) para o desenvolvimento da doença. Esse achado corrobora com as principais hipóteses da patogenia da PIF já previamente comentadas (BORIE et al., 2015).

Neste estudo, ainda foram identificadas variantes genéticas raras em sete pacientes (21,2%), todas elas relacionadas com a biologia do complexo telômero-telomerase. No entanto, apenas três destes pacientes tiveram comprimentos teloméricos curtos para a idade. Outros dois pacientes que também apresentaram encurtamento telomérico eram portadores de variantes comuns nos três genes: TERT, TOLLIP e MUC5B.

Devido ao encurtamento telomérico, surgem mecanismos patogênicos como defeitos na maquinaria de reparo do DNA, perda de células-tronco e instabilidade do material genético, que culminam em lesões celulares e teciduais, determinando as doenças que compõem as “telomeropatias” (CALADO; YOUNG, 2008). Além disso, pacientes com PIF e FPI exibem telômeros significativamente mais curtos comparado aos controles, pareados por idade, tanto nos leucócitos do sangue periférico quanto nas células epiteliais alveolares, independentemente de serem portadores, ou não, de mutação nos genes da telomerase (ALDER et al., 2008; KROPSKI et al., 2014; THEALL et al., 2013). Tendo em vista tais informações, e ainda o número de indivíduos portadores de alguma variante rara ou comum em

genes relacionados com o complexo telômero-telomerase, seria esperada uma frequência maior de indivíduos com encurtamento telomérico, neste trabalho. Por outro lado, observou-se que a maioria desses casos apresentava comprimentos teloméricos abaixo do P50 (85,7%), quando comparados com a população saudável pareada pela idade. Tais achados estão em concordância com o estudo realizado por Alder et al. (2018). Segundo o referido estudo, o limite da normalidade estabelecido para o comprimento telomérico como abaixo do P1 para a idade não abrangeu nenhum dos adultos com mais de 60 anos de idade que possuíam mutações relacionadas à biologia dos telômeros. Além disso, tais indivíduos possuíam comprimentos teloméricos em percentis menores do que a da população sadia (abaixo do P50), frequentemente sobrepondo o P10 dos controles. Segundo opinião dos autores, o nível de encurtamento telomérico correlaciona-se com a idade ao diagnóstico, bem como ao fenótipo clínico da telomeropatia, sendo que telômeros extremamente curtos correlacionam-se com insuficiência de medula óssea e imunodeficiência em crianças e adultos jovens, enquanto defeitos mais leves se manifestariam como doença pulmonar em adultos mais velhos. No atual estudo, apenas um indivíduo apresenta comprimento telomérico abaixo do P1 para a idade. Esse indivíduo, além de ser mais jovem, possui um fenótipo clínico mais grave, com falência de medula óssea, hepatopatia crônica e doença pulmonar fibrosante de rápida evolução.

Das variantes raras identificadas neste trabalho, duas ainda não haviam sido registradas nos bancos de dados genéticos até o momento (GnomAD). Tais variantes são localizadas em TERT e RTEL1, que são genes já associados com o desenvolvimento de PIF em estudos anteriores (ARMANIOS et al., 2007; COGAN et al., 2015). No gene TERT, trata-se de uma mutação não-sinônima (*missense*) e, em RTEL1, uma mutação sem sentido (*nonsense*). Possuem uma considerável pontuação no CADD, o que confere a classificação dessas variantes como “potencialmente patogênicas”. Para as mutações identificadas em TERT (c.1730G>A) e em RTEL1 (c.2299C>T), foram obtidas pontuações de 33 e 39 na classificação de CADD, respectivamente. Conforme sugerido pelo grupo elaborador do sistema de pontuação do CADD, foi assumido um limite da pontuação de 15, acima da qual a variante foi considerada potencialmente patogênica (UNIVERSIDADE DE WASHINGTON, 2013, 2014).

Na família com a nova variante descoberta em TERT, as três filhas do caso índice apresentaram a mutação, porém somente em uma delas houve evidências de DIP na TCAR de tórax. Tal achado poderia ser explicado pela possível penetrância incompleta da mutação; pelos diferentes fatores ambientais a que foram expostas, ou então pelo fator “idade”, já que o envelhecimento também representa importante fator de risco para o desenvolvimento das doenças fibrosantes pulmonares (FANER et al., 2012). A penetrância incompleta de mutações em TERT já foi bem descrita em estudo prévio, em que foi constatado que somente 50% das mulheres portadoras de mutações em TERT apresentaram evidências de doença pulmonar (DIAZ DE LEON et al., 2010). A maioria dos portadores de mutação que desenvolvem a fibrose pulmonar relatam uma história prévia de exposição ao cigarro ou a outros agentes fibrogênicos, sugerindo um papel do ambiente em modular o risco de indivíduos geneticamente suscetíveis (MATHAI et al., 2016). Observando as exposições individuais desta família, constatou-se que as três filhas da paciente possuem fatores ambientais de risco para a doença: duas possuem exposição atual a pássaros, sendo uma delas a que já possui sinais de doença pulmonar na TCAR, e ainda, uma com história pregressa de tabagismo. Considerando que a mãe (paciente caso índice) iniciou quadro clínico da doença pulmonar aos 76 anos e as filhas possuem idade entre 41 e 54 anos, e sabendo-se da presença de tais fatores ambientais e genéticos, fica evidente que elas estão em risco de desenvolver PIF. A necessidade de seguimento clínico e radiológico para diagnóstico precoce, bem como aconselhamento quanto ao afastamento dos fatores de exposição ambiental parecem óbvios; no entanto, o impacto destas medidas no desenvolvimento e no prognóstico da PIF precisa ser melhor avaliado com estudos longitudinais desenhados para tal.

A mutação encontrada em TERT está no domínio da extensão N-terminal (NTE), uma região extremamente conservada entre os eucariotos e essencial para a atividade da telomerase (GOMEZ et al., 2012). Mutações em TERT têm o potencial de afetar a atividade catalítica da telomerase nos finais dos cromossomos, o que poderia levar à disfunção e encurtamento do telômero que são a base para o desenvolvimento das doenças incluídas no espectro das telomeropatias. A doença ocorre por haploinsuficiência. A redução da atividade da telomerase, devido à presença de um alelo mutante, pode ser crítica na presença de condições que estimulem o encurtamento telomérico como, por exemplo, a inalação da fumaça do

cigarro, ou mesmo o contato com outros agentes tóxicos que possam levar ao estresse das células epiteliais alveolares (BERTUCH, 2016).

Coletivamente, as variantes raras de função deletéria são encontradas mais frequentemente no gene TERT do que nos demais genes associados a fibrose pulmonar (MATHAI et al., 2016). Variantes raras patogênicas em TERT são encontradas em aproximadamente 15% dos casos de PIF e em 3% dos casos de FPI (CRONKHITE et al., 2008; TSAKIRI et al., 2007). No atual estudo, foram encontradas variantes raras em TERT em 3 (9,1%) casos de PIF, tendo todos os pacientes apresentado encurtamento telomérico.

Indivíduos com variantes raras em RTEL1 apresentaram comprimentos teloméricos entre P10 e P50. Da mesma forma que para a nova variante rara identificada em TERT, foram analisados os familiares do caso índice portador da nova variante rara observada em RTEL1. O mais interessante foi que todos os irmãos do caso índice apresentaram DIP em estágios diversos da doença, que variava desde DIP incipiente até doença pulmonar fibrosante avançada que culminou com o óbito. No entanto, dos cinco irmãos que foram submetidos à pesquisa da mutação, apenas três eram portadores. Além disso, nenhum deles apresentou comprimento telomérico abaixo do P1, muito embora dois deles estavam no limite do P10 e os demais estavam entre P10 e P50.

Tal variante rara descoberta no gene RTEL1 (c.2299C>T) ocorre no domínio rad3 da helicase, gerando uma proteína truncada (p.R767X) que perde os domínios Harmonin, PIP e RING da isoforma 2 (SPECKMANN et al., 2017).

RTEL1 está associada ao desenvolvimento de síndromes teloméricas (BALLEW et al., 2013; COGAN et al., 2015; LE GUEN et al., 2013; WALNE et al., 2013). Possui função tanto em sítios teloméricos como em não teloméricos. É uma DNA helicase que desmancha estruturas em D-loop e, dessa forma, previne a perda telomérica durante a fase de replicação, evitando o acúmulo de DNA telomérico extracromossômico, conhecido como T-círculos (BARBER et al., 2008; VANNIER et al., 2012). Estimativas revelam que as mutações em RTEL1 estão presentes em aproximadamente 5% dos casos de PIF (KANNENGIESSER et al., 2015; STANLEY; NOTH; ARMANIOS, 2015; STUART et al., 2015). A quantidade de RTEL1 provavelmente é a responsável pelos graus diversos de encurtamento telomérico observados nos indivíduos com as mutações, e o fenótipo da fibrose pulmonar refletiria defeitos teloméricos mais leves (ARMANIOS, 2013). Tal informação

explicaria os diferentes comprimentos teloméricos e fenótipos observados na família estudada. No entanto, ainda deve ser esclarecido o fato de alguns membros da família manifestarem a doença, mesmo não sendo portadores da mutação e com comprimento telomérico considerado normal, pelos limites de normalidade adotados. É possível que a interação com fatores ambientais e com outros fatores genéticos, como variantes comuns e fatores epigenéticos ainda desconhecidos, modulem a expressão do gene RTEL1 e interfiram no comprimento telomérico. Apesar dos conhecimentos do papel de RTEL1 em regular o comprimento telomérico, o mecanismo exato através do qual mutações específicas causam o encurtamento do telômero e o desenvolvimento da doença ainda é objeto de pesquisas em andamento (STANLEY; NOTH; ARMANIOS, 2015). Pode ser que a senescência de células epiteliais alveolares e o consequente defeito regenerativo deste tecido sejam a base fisiopatológica da fibrose pulmonar mediada pelos telômeros (STANLEY; NOTH; ARMANIOS, 2015).

Neste estudo, foram ainda identificados em dois pacientes, variantes raras de dois outros genes que têm papel da biologia do telômero, mas que ainda não há registro na literatura de estarem associados à fibrose pulmonar. Nestas variantes identificadas, ocorrem uma duplicação em WRAP53 (c.1558dupG) e uma deleção em SHQ1 (c.828_831del), gerando mutações do tipo mudança de fase de leitura (*frameshift*), que resulta na tradução de proteínas disfuncionais.

O gene WRAP53 codifica o TCAB1, um componente essencial para estruturas subnucleares dinâmicas, conhecidas como corpúsculos de *Cajal* (HERINKSSON; FARNEBO, 2015). A depleção de TCAB1 resulta em uma realocação da telomerase dos corpúsculos de *Cajal* para o nucléolo, além de redução do recrutamento da telomerase para os telômeros e encurtamento telomérico (VENTEICHER et al., 2009; ZHONG et al., 2011, 2012). As células de pacientes com mutações em WRAP53 possuíam atividade da telomerase intacta, quando medida em lisados celulares *in vitro*, porém demonstraram reduzida capacidade de ligação da telomerase com o telômero, além de defeito no transporte da telomerase para o nucléolo (ZHONG et al., 2011). Mutações heterozigotas em WRAP53 foram associadas com DC, porém nunca com fibrose pulmonar (BERTUCH, 2016).

O gene SHQ1 codifica uma ribonucleoproteína H/ACA que leva o mesmo nome. As ribonucleoproteínas H/ACA são diversas nos mamíferos e possuem

função em variados processos, incluindo modificação e processamento dos RNAs ribossomais, modificação dos pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNAs*) e estabilização da telomerase (GROZDANOV et al., 2009). Mutações em genes que codificam ribonucleoproteínas H/ACA que participam da biogênese da telomerase e de sua estabilização já foram associadas ao desenvolvimento de DC: DKC1, NHP2, NOP10 e TERC (TRAHAN; DRAGON, 2009; TRAHAN; MARTEL; DRAGON, 2010). Outros componentes que participam deste complexo, como PARN e NAF1, já foram associados com o desenvolvimento de PIF (STANLEY et al., 2016; STUART et al., 2015). Neste contexto, há apenas um relato de caso de possível associação genética entre SHQ1 e uma variante mais grave do espectro de apresentações clínicas da DC, a síndrome de *Hoyeraal-Hreidarsson* (BIZARRO; MEIER, 2017). Não há na literatura nenhum relato de associação entre alterações genéticas em SHQ1 e doença pulmonar.

O presente trabalho revelou uma importante participação da biologia do telômero e da telomerase na patogênese da PIF nos pacientes brasileiros. Considerando que as variantes raras encontradas possuem atuação na biologia do complexo telômero-telomerase, pode-se especular que juntas contabilizam cerca de 21% dos casos de PIF. Descrições atualizadas revelam que mutações relacionadas aos telômeros são encontradas em aproximadamente 25% dos casos de PIF e em 10% dos casos esporádicos de FPI (HOFFMAN et al., 2018).

Além disso, foram identificadas duas novas variantes genéticas raras, ainda não descritas nos principais bancos de dados e também, duas variantes raras já associadas com a biologia dos telômeros, porém sem associação prévia com FPI ou PIF. Tais variantes representam um grande desafio, já que ainda é necessário determinar seu real significado clínico. A partir da identificação de uma variante rara, o próximo passo é submetê-la a um “purgatório genético”, a fim de se estabelecer o prognóstico e os riscos para o paciente e seus familiares que apresentaram tal alteração genética. A avaliação da patogenicidade de cada variante rara requer análise de segregação na família e/ou demonstração de dados na função da proteína, através dos chamados testes funcionais (MATHAI et al., 2016).

A análise da segregação familiar das novas variantes descritas em TERT e RTEL1 indica que sejam patogênicas. Além disso, possuem baixa frequência na população (nunca foram relatadas) e elevada pontuação no CADD.

Já as variantes raras encontradas em SHQ1 e WRAP53 necessitam ainda de mais análises para poderem ser consideradas como patogênicas para o desenvolvimento da PIF. Devido à dificuldade em se estudar os familiares desses pacientes em questão, análises mais específicas de outros componentes das vias biológicas, em que participam, ajudariam a comprovar os papéis destas mutações na patogênese da PIF. A escassez dessas informações representa uma importante limitação deste trabalho, pois poderiam comprovar seu papel patogênico. Algumas dessas análises já estão em andamento e, em breve, serão obtidos maiores conhecimentos a respeito de sua associação com a doença.

Os estudos de associação genética representam uma fascinante ferramenta não apenas para o conhecimento do desenvolvimento da doença em um único paciente ou família estudados, mas também a possibilidade de descoberta de vias da patogênese, que possam ser relevantes para uma população mais ampla de pacientes com doença pulmonar fibrosante. Nesse aspecto, a identificação de SHQ1 e WRAP53 é promissora em adicionar novas informações a respeito de tais vias da patogênese.

A diversidade de combinações de variantes genéticas comuns e raras comprovam a heterogeneidade molecular da PIF, que também ocorre a nível clínico, radiológico e anatomopatológico e aponta para a necessidade de se manejar essa doença também de maneira diferenciada. Mais estudos são necessários para que se possam incluir as informações genéticas na estratificação de risco destes pacientes, de acordo com a taxa esperada de progressão da doença e sua resposta aos tratamentos. Grandes estudos clínicos de intervenção deveriam considerar o impacto dessas diferentes variantes genéticas, ao se testarem possíveis novas terapêuticas.

Este trabalho traz importantes informações dos pacientes brasileiros com PIF, até então desconhecidas. Através dele, conseguimos evidências do peso dos fatores ambientais em determinar a doença nos indivíduos geneticamente predispostos. Este aspecto peculiar, em conjunto com as informações genéticas, poderá, num futuro próximo, ser decisivo no manejo dos pacientes.

A maior limitação deste trabalho foi a coleta de dados ocorrer em poucos centros, restringindo a avaliação a uma região restrita. Tal fato limitou ainda o estudo de uma amostra com maior número de indivíduos que poderiam fornecer maiores informações. Estudos mais amplos, de diversas regiões do país, são essenciais para

melhor caracterização dos pacientes brasileiros com PIF, considerando a grande diversidade genética e sociocultural da população deste país.

Outra limitação deste estudo é o fato de terem sido descritos apenas características dos casos índice. Mesmo tendo sido feito um esforço para investigar outros membros das famílias, infelizmente, o comparecimento de familiares, sintomáticos ou não, foi pequeno. Assim, dispomos de poucas famílias adequadamente investigadas, a grande maioria delas com dados insuficientes para descrições mais aprofundadas. Com o estudo limitado apenas aos casos índice, garantiu-se homogeneidade do critério de inclusão.

A PIF é uma doença progressiva, incapacitante e fatal, que marca a história de muitas famílias. Ainda há poucas alternativas terapêuticas eficazes, mas o crescimento exponencial dos conhecimentos de suas bases fisiopatológicas, nas últimas décadas, representa a esperança do surgimento de melhores alternativas para aconselhamento e tratamento dos pacientes e seus familiares, em um futuro não muito distante. Nesse contexto, é vital o conhecimento das características particulares dos pacientes deste país.

Em resumo, este é um estudo pioneiro no Brasil, que trouxe informações importantes sobre aspectos clínicos e genéticos de pacientes brasileiros com PIF, e que identificou novas variantes genéticas possivelmente associadas com o desenvolvimento deste tipo de doença nos seres humanos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que, em pacientes brasileiros com Pneumonia Intersticial Familiar:

- a) Ocorre acentuada heterogeneidade das formas de apresentação clínica, radiológica e anatomopatológica;
- b) O padrão tomográfico mais comum é o inconsistente com PIU;
- c) Variantes genéticas comuns dos genes MUC5B, TOLLIP e TERT aparecem em aproximadamente 90% dos casos;
- d) Variantes genéticas raras são detectadas em aproximadamente 1/5 dos casos e limitam-se a genes relacionados com a biologia dos telômeros;
- e) A prevalência de comprimentos teloméricos abaixo do percentil 50% da normalidade gira em torno de 86%, ainda que encurtamento telomérico real, aquém do percentil 10%, seja pouco frequente (14,6%);
- f) As mutações c.1730G>A em TERT e c.2299C>T em RTEL1, muito provavelmente, se associam com o desenvolvimento da doença pulmonar;
- g) Anormalidades nos genes WRAP53 e SHQ1 também podem estar envolvidas com o estabelecimento de quadros fibróticos pulmonares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDER, J. K. et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 35, p. 13051-13056, 2008.

ALDER, J. K. et al. Telomere phenotypes in females with heterozygous mutations in the dyskeratosis congênita 1 (DKC1) gene. **Human Mutation**, v. 34, n. 11, p. 1481-1485, 2013.

ALDER, J. K. et al. Exome sequencing identifies mutant TINF2 in a family with pulmonary fibrosis. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1361-1368, 2015.

ALDER, J. K. et al. Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 10, e2358-2365, 2018. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/115/10/E2358>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

ALTER, B. P. et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. **Blood**, v. 110, n. 5, p. 1439-1447, 2007.

ARAKI, T. et al. Development and progression of interstitial lung abnormalities in the Framingham Heart Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 194, n. 12, p. 1514-1522, 2016.

ARMANIOS, M. et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 44, p. 15960-15964, 2005.

ARMANIOS, M. et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 13, p. 1317-1326, 2007.

ARMANIOS, M. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. **Mutation Research**, v. 730, n. 1-2, p. 52-58, 2012.

ARMANIOS, M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 3, p. 996-1002, 2013.

BALLEW, B. J. et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in dyskeratosis congenita. **Human Genetics**, v. 132, n. 4, p. 473-480, 2013.

BADINNI-MARTINEZ, J. et al. Exame físico do tórax e do aparelho respiratório. In: BADDINI-MATINEZ, J.; DANTAS, M.; VOLTARELLI, J. C. (Ed.). **Semiologia Geral e Especializada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 102-122.

BARBER, L. J. et al. RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. **Cell**, v. 135, n. 2, p. 261-271, 2008.

BENNETT, D. et al. Familial pulmonary fibrosis: Clinical and radiological characteristics and progression analysis in different high resolution-CT patterns. **Respiratory Medicine**, v. 126, n. 5, p. 75-83, 2017.

BERTUCH, A. A. The molecular genetics of the telomere biology disorders. **RNA Biology**, v. 13, n. 8, p. 696-706, 2016.

BIZARRO, J.; MEIER, U. T. Inherited SHQ1 mutations impair interaction with NAP57/dyskerin, a major target in dyskeratosis congenita. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 5, n. 6, p. 805-808, 2017.

BONANNI, P. P.; FRYMOYER, J. W.; JACOX, R. F. A family study of idiopathic pulmonary fibrosis. A possible dysproteinemic and genetically determined disease. **The American Journal of Medicine**, v. 39, p. 411-421, 1965.

BORIE, R. et al. The MUC5B variant is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with systemic sclerosis interstitial lung disease in the European Caucasian population. **PLoS One**, v. 8, n. 8, e70621, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0070621>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

BORIE, R. et al. Familial pulmonary fibrosis. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 32, n. 4, p. 413-434, 2015.

BULUT, Y. et al. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 987-994, 2001.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4446-4455, 2008.

CALADO, R. T.; YOUNG, N. S. Telomere diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2353-2365, 2009.

CALADO, R.; YOUNG, N. Telomeres in disease. **F1000 Medicine Reports**, v. 4, p. 8, 2012.

CAMPO, I. et al. A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant. **Respiratory Research**, v. 15, n. 1, p. 43, 2014.

CHANG, X.; WANG, K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. **Journal of medical genetics**, v. 49, n. 7, p. 433-436, 2012.

CHUNG, J. H. et al. CT Scan findings of probable usual interstitial pneumonitis have a high predictive value for histologic usual interstitial pneumonitis. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 450-459, 2015.

CHUNG, J. H. et al. CT imaging phenotypes of pulmonary fibrosis in the MUC5B promoter site polymorphism. **Chest**, v. 149, n. 5, p. 215-222, 2016.

CHURG, A.; WRIGHT, J. L.; TAZELAAR, H. D. Acute exacerbations of fibrotic interstitial lung disease. **Histopathology**, v. 58, n. 4, p. 525-530, 2011.

COGAN, J. D. et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 6, p. 646-655, 2015.

COHEN, S. B. et al. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. **Science**, v. 315, n. 5820, p. 1850-1853, 2007.

COLLINS, K.; MITCHELL, J. R. Telomerase in the human organism. **Oncogene**, v. 21, n. 4, p. 564-579, 2002.

CORDIER, J. F.; COTTIN, V. Neglected evidence in idiopathic pulmonary fibrosis: from history to earlier diagnosis. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 4, p. 916-923, 2013.

COTTIN, V.; RICHELDI, L. Neglected evidence in idiopathic pulmonary fibrosis and the importance of early diagnosis and treatment. **European Respiratory Review**, v. 23, n. 131, p. 106-110, 2014.

CRONKHITE, J. T. et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 178, n. 7, p. 729-737, 2008.

CROSSNO, P. F. et al. Identification of early interstitial lung disease in an individual with genetic variations in ABCA3 and SFTPC. **Chest**, v. 137, n. 4, p. 969-973, 2010.

DIAZ DE LEON, A. et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10680, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010680>>. Acesso em: 08 abr. 2018.

DOKAL, I. Dyskeratosis congenita in all its forms. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 4, p. 768-779, 2000.

EPAUD, R. et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome associated with ABCA3 mutations. **European Respiratory Journal**, v.43, n. 2, p. 638-641, 2014.

FANER, R. et al. Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 4, p. 206-213, 2012.

- FERNANDEZ, B. A. et al. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. **Respiratory Research**, v. 13, n. 1, p. 64, 2012.
Disponível em: <<http://respiratory-research.com/content/13/1/64>> DOI:10.1186/1465-9921-13-64. Acesso em: 13 mar. 2018.
- FINGERLIN, T. E. et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 613-620, 2013.
- FUKUHARA, A. et al. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congênita with TINF2 gene mutation. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. 6, p. 1757-1759, 2013.
- GARCÍA-SANCHO, C. et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Medicine**, v. 105, n. 12, p. 1902-1907, 2011.
- GENOME AGGREGATION DATABASE (GNOMAD). Disponível em: <<http://gnomad.broadinstitute.org/>>. Acesso em 20 dez. 2017.
- GOMEZ, D. E. et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 5, p. 1561-1569, 2012.
- GRAMATGES, M. M.; BERTUCH, A. A. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. **Translational Research**, v. 162, n. 6, p. 353-363, 2013.
- GROZDANOV, P. N. et al. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. **RNA**, v. 15, n. 6, p. 1188-1197, 2009.
- GUTIERREZ-RODRIGUES, F. et al. Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113747, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113747>>. Acesso em: 11 abr. 2018.
- HEISS, N. S. et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. **Nature Genetics**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 1998.
- HENRIKSSON, S.; FARNEBO, M. On the road with WRAP53beta: guardian of Cajal bodies and genome integrity. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 91, 2015. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2015.00091/full>>. Acesso em: 08 abr. 2018.
- HISATA, S. et al. A novel missense mutation of DKC1 in dyskeratosis congenita with pulmonary fibrosis. **Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG**, v. 30, n. 3, p. 221-225, 2013.

HODGSON, U.; LAITINEN, T.; TUKIAINEN, P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence of founder effect among multiplex families in Finland. **Thorax**, v. 57, n. 4, p. 338–342, 2002.

HOFFMAN, T. W. et al. Pulmonary phenotypes associated with genetic variation in telomere-related genes. **Current opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 3, p. 269-280, 2018.

HORIMASU, Y. et al. MUC5B promoter polymorphism in Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **Respirology**, v. 20, n. 3, p. 439-444, 2015.

HUNNINGHAKE, G. M. et al. MUC5B promoter polymorphism and interstitial lung anormalities. **The New Englang Journal of Medicine**, v. 368, n. 23, p. 2192-2200, 2013.

KANNENGIESSER, C.; BORIE, R.; REVY, P. Pulmonary fibrosis associated with TINF2 gene mutation: is somatic reversion required? **European Respiratory Journal**, v. 44, n. 1, p. 269-270, 2014.

KANNENGIESSER, C. et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 46, n. 2, p. 474-485, 2015.

KAUR, A.; MATHAI, S. K.; SCHWARTZ, D. A. Genetics in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis, prognosis, and treatment. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 154, 2017.

KIRCHER, M. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 310-315, 2014.

KOLB, M.; WHITE, E. S.; GAULDIE, J. Mucking around in the genome: MUC5B in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 4, p. 355-357, 2016.

KOVELIS, D. et al. Validation of the modified pulmonary functional status and dyspnea questionnaire and the medical research council scale for use in Brazilian patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 12, p. 1008-1018, 2008.

KROPSKI, J. A. et al. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 9-17, 2013.

KROPSKI, J. A. et al. A novel dyskerin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. **Chest**, v. 146, n. 1, p. e1–e7, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.13-2224>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

KROPSKI, J. A.; BLACKWELL, T. S.; LOYD, J. E. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 45, n. 6, p. 1717-1727, 2015.

KROPSKI, J. A. et al. Genetic evaluation and testing of patients and families with idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1423-1428, 2017.

KURANISHI, L. T. et al. Airway-centered interstitial fibrosis: etiology, clinical findings and prognosis. **Respiratory Research**, v. 16, p. 55, 2015.

LANSDORP, P. M. et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. **Human molecular genetics**, v. 5, n. 5, p. 685-691, 1996.

LAWSON, W. E.; LOYD, J. E. The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease? **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 3, n. 4, p. 345-349, 2006.

LAWSON, W. E. et al. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. **American Journal of Physiology Lung cellular and molecular physiology**, v. 294, n. 6, L1119-1126, 2008. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00382.2007>>. Acesso em: 11 fev. 2018.

LEE, H. L. et al. Familial Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **Chest**, v. 127, n. 6, p. 2034-2041, 2005.

LEE, H. Y. et al. High-resolution CT scan findings in familial interstitial pneumonia do not conform to those of idiopathic interstitial pneumonia. **Chest**, v. 142, n. 6, p. 1577-1583, 2012.

LE GUEN, T. et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 16, p. 3239-3249, 2013.

LEK, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 285-291, 2016.

LESLIE, K. O. et al. Familial idiopathic interstitial pneumonia: histopathology and survival in 30 patients. **Archives of pathology & Laboratory Medicine**, v. 136, n. 11, p. 1366-1376, 2012.

LEY, B. et al. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 5, n. 8, p. 639-647, 2017. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(17\)30216-3/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(17)30216-3/fulltext)>. Acesso em 07 abr. 2014.

LOYD, J. E. Pulmonary fibrosis in families. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, p. S47-50, 2006. Suplemento 3.

MACNEAL, K.; SCHWARTZ, D. A. The genetic and environmental causes of pulmonary fibrosis. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 9, n. 3, p. 120-125, 2012.

MATHAI, S. K.; SCHWARTZ, D. A.; WARG, L. A. Genetic susceptibility and pulmonary fibrosis. **Current opinion in Pulmonary Medicine**, v. 20, n. 5, p. 429-435, 2014.

MATHAI, S. K. et al. Incorporating genetics into the identification and treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **BMC Medicine**, v. 13, p. 191, 2015. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0434-0>>. Acesso em: 07 abr. 2018.

MATHAI, S. K. et al. Pulmonary fibrosis in the era of stratified medicine. **Thorax**, v. 71, n. 12, p. 1154-1160, 2016.

MARSHALL, R. P. et al. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. **Thorax**, v. 55, n. 2, p. 143-146, 2000.

MERCK, S. J.; ARMANIO, M. Shall we call them “telomere-mediated”? Renaming the idiopathic after the cause is found. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 6, p. 1556-1558, 2016.

MILLER, R. et al. Hypersensitivity pneumonitis a perspective from members of the Pulmonary Pathology Society. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 1, p. 120-126, 2018.

MORRIS, A.; GIBSON, K.; COLLMAN, R. G. The lung microbiome in idiopathic fibrosis: what does it mean and what should we do about it? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 8, p. 850-852, 2014.

MULUGETA, S. et al. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, n. 6, p. 521-530, 2005.

MUSHIRODA, T. et al. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. **Journal of Medical Genetics**, v. 45, n. 10, p. 654-656, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

NEDER, J. A. et al. Reference values for lung function tests. I. Static volumes. **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 32, n. 6, p. 703-717, 1999.

NEDER, J. A. et al. Reference values for lung function tests. III. Carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). **Brazilian Journal of medical and biological research**, v. 32, n. 6, p. 729-737, 1999.

NEWTON, C. A. et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 6, p. 1710-1720, 2016.

NOGEE, L. M. et al. A mutation in the surfactante protein C gene associated with familial interstitial lung disease. **The New Englang Journal of Medicine**, v. 344, n. 8, p. 573-579, 2001.

NOTH, I. et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 1, n. 4, p. 309-317, 2013.

ONO, S. et al. Surfactant protein C G100S mutation causes familial pulmonar fibrosis in Japanese kindred. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 4, p. 861-869, 2011.

PALM, W.; DE LANGE, T. How shelterin protects mammalian telomeres. **Annual review of genetics**, v. 42, p. 301-334, 2008.

PEABODY, J. W. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis; its occurrence in identical twin sisters. **Diseases of the chest**, v. 18, n. 4, p. 330-344, 1950.

PELJTO, A. L. et al. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 309, n. 21, p. 2232-2239, 2013.

PELJTO, A. L. et al. The MUC5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonar fibrosis in a Mexican cohort but is rare among Asian ancestries. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 460-464, 2015.

PEREIRA, C. A.; SATO, T.; RODRIGUES, S. C. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 4, p. 397-406, 2007.

PUTMAN, R. K.; ROSAS, I. O.; HUNNINGHAKE, G. M. Genetics and early detection in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratoy and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 7, p. 770-778, 2014.

PUTMAN, R. K. et al. Association between interstitial lung abnormalities and all-cause mortality. **The Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 7, p. 672-681, 2016.

QAZILBASH, M. H. et al. A new syndrome of familial aplastic anemia and chronic liver disease. **Acta Haematologica**, v. 97, n. 3, p. 164-167, 1997.

RAGHU, G. et al. An official ATS/ ERS/ JRS/ ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. **American Journal of Respiratoy and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 6, p. 788-824, 2011.

ROSAS, I. O. et al. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 7, p. 698-705, 2007.

ROY, M. G. et al. MUC5B is required for airway defense. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 412-416, 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, M. K.; FABRO, A. T.; BADDINI-MATINEZ, J. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 6, n. 2, e5, 2018. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600\(18\)30019-5/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lanres/article/PIIS2213-2600(18)30019-5/fulltext)>. Acesso em 07 abr. 2018.

SILVA, C. I. et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis: differentiation from idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia by using thin-section CT. **Radiology**, v. 246, n. 1, p. 288-297, 2008.

SEILBOLD, M. A. et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 16, p. 1503-1512, 2011.

SEIBOLD, M. A. et al. The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58658, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058658>>. Acesso em 07 abr. 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Diretrizes para testes de função pulmonar. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, p. S1-82, 2002. Suplemento 3.

SØRENSEN, P. G.; ROSSING, N.; RØRTH, M. Carbon monoxide diffusing capacity: a reliable indicator of bleomycin-induced pulmonary toxicity. **European Journal of Respiratory Diseases**, v. 66, n. 5, p. 333-340, 1985.

SPAGNOLO, P.; GRUNEWALD, J.; DU BOIS, R. M. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 2, n. 5, p. 416-428, 2014.

SPAGNOLO, P.; COTTIN, V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalized medicine. **Journal of Medical Genetics**, v. 54, n. 2, p. 93-99, 2017.

SPECKMANN, C. et al. Clinical and molecular heterogeneity of RTEL1 deficiency. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 449, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00449/full>>. Acesso em 08 abr. 2018.

STANLEY, S. E.; NOTH, I.; ARMANIOS, M. What the Genetics “RTEL”ing us about telomeres and pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 6, p. 608-610, 2015.

STANLEY, S. E. et al. Loss-of-function mutations in the RNA biogenesis factor NAF1 predispose to pulmonary fibrosis-emphysema. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 351, p. 1–10, 2016.

STEELE, M. P. et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 9, p. 1146-1152, 2005.

STOCK, C. J. et al. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis but not with development of lung fibrosis in systemic sclerosis or sarcoidosis. **Thorax**, v. 68, n. 5, p. 436-441, 2013.

STUART, B. D. et al. Effect of telomere length on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an observational cohort study with independent validation. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 2, n. 7, p. 557-565, 2014.

STUART, B. D. et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 512-517, 2015.

TANJORE, H. et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 35, p. 30972-30980, 2011.

THEALL, K. P. et al. Early hits and long-term consequences: tracking the lasting impact of prenatal smoke exposure on telomere length in children. **American Journal of Public Health**, v. 103, p. S133-135, 2013. Suplemento 1.

THE 1000 GENOMES PROJECT. Baseado em Ensembl v80 GRCh37. Disponível em: <<http://phase3browser.1000genomes.org/index.html>>. Acesso em 20 dez. 2017.

THOMAS, A. Q. et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 9, p. 1322-1328, 2002.

TRAHAN, C.; DRAGON, F. Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human telomerase RNA affect its assembly into a pre-RNP. **RNA**, v. 15, n. 2, p.235-243, 2009.

TRAHAN, C.; MARTEL, C.; DRAGON, F. Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 5, p. 825-836, 2010.

TRAVIS, W. D. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 6, p. 733-748, 2013.

TSAKIRI, K. D. et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7552-7557, 2007.

TZOUVELEKIS, A., KAMINSKI, N. Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 93, n. 2, p. 159-170, 2015.

UNIVERSIDADE DE WASHINGTON, 2013-2014. Combined Annotation Dependent Depletion (CADD). Disponível em: <<http://cadd.gs.washington.edu/>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

VAN MOORSEL, C. H. M. et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 11, p. 1419-1425, 2010.

VANNIER, J. B. et al. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. **Cell**, v. 149, n. 4, p. 195-806, 2012.

VENTEICHER, A. S. et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. **Science**, v. 323, n. 5914, p. 644-648, 2009.

VULLIAMY, T. et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. **Nature**, v. 413, n. 6854, p. 432-435, 2001.

WALNE, A. J. et al. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. **American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 3, p. 448-453, 2013.

wANNOVAR. Wang Genomics Lab, 2012-2018. Disponível em: <<http://wannovar.wglab.org/>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

WANG, C. et al. Mucin 5B promoter polymorphism is associated with susceptibility to interstitial lung diseases in Chinese males. **PLoS One**, v. 9, n. 8, e104919, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0104919>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

WANG, Y. et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. **The American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 1, p. 52-59, 2009.

WEI, R. et al. Association between MUC5B and TERT polymorphisms and different interstitial lung disease phenotypes. **Translational Research**, v. 163, n. 5, p. 494-502, 2014.

- YAMAGUCHI, H. et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase in aplastic anemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 14, p. 1413-1424, 2005.
- YANG, H.; WANG, K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. **Nature Protocols**, v. 10, p. 1556-1566, 2015.
- YANG, I. V. et al. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 1, p. 45-54, 2007.
- YANG, I. V. et al. MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, S193-199, 2015. Suplemento 2.
- ZHANG, Y. et al. A variant in the promoter of MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 16, p. 1576-1577, 2011.
- ZHONG, F. et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. **Genes & development**, v. 25, n. 1, p. 11-16, 2011.
- ZHONG, F. L. et al. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. **Cell**, v. 150, n. 3, p. 481-494, 2012.
- ZHU, L. et al. Tollip, an intracellular trafficking protein, is a novel modulator of the transforming growth factor-beta signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39653-39663, 2012.

APÊNDICE A – Avaliação funcional pulmonar de 35 indivíduos casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

Paciente	CPT (absoluto)	CPT (% do previsto)	CVF (absoluto)	CVF (% do previsto)	VEF1 (absoluto)	VEF1 (% do previsto)	VEF1/CVF (absoluto)	VEF1/CVF (% do previsto)	Dco (absoluto)	Dco (% do previsto)
1	4,78	61,5	3,32	62,3	3,03	69,3	91	110,8	8,44	21,5
2	2,49	55	1,69	59,7	1,55	66,4	92	112	8,66	36,9
3	6,28	91,9	4,26	94,4	3,46	95,6	81	101,2	16,95	49,3
4	3,74	49,6	2,19	49,7	2,18	61,2	99	124	13,46	36,5
5	4,29	77,5	2,61	71,9	1,95	68,5	75	95,5	7,46	26,1
6	3,75	80,4	2,57	92,8	2,23	101,1	87	109,3	13,94	59,9
7	2,8	58,4	1,66	59,6	1,38	63,4	83	106,1	9,59	41,1
8	3,92	68	2,27	59,5	1,98	66,3	87	110,9	14,58	49,5
9	5,69	100,7	2,7	77,4	2,06	75,8	76	97,5	8,79	30,7
10	3,53	88,7	1,36	63,6	1,15	68,8	85	107,7	7,16	34,6
11	2,71	57,1	1,31	52	1,18	63,6	90	120	3,84	17,2
12	2,79	56,5	1,82	62,4	1,7	74,4	93	118,8	8,45	35,4
13	7,39	96,5	3,85	96,1	3,09	101,5	80	106,3	19,59	57,2
14	6,06	95,3	2,87	76	2,31	81	81	106,7	11,74	39,2
15	3,96	81,4	1,72	60,5	1,29	58,1	75	95,9	13,67	58
16	3,12	52	2,07	53,1	1,96	63,7	95	120,6	ND	ND
17	4,44	93,8	2,63	95,7	1,93	89,8	73	93,1	12,61	54,4
18	4,02	84,7	2,13	79,3	1,8	87,1	84	108,5	ND	ND
19	5,07	61,5	3,93	74,8	3,41	79,4	87	106,8	16,76	41,3

(Continua)

APÊNDICE A – Avaliação funcional pulmonar de 35 indivíduos casos índice de Pneumonia Intersticial Familiar

(Continuação)

Paciente	CPT (absoluto)	CPT (% do previsto)	CVF (absoluto)	CVF (% do previsto)	VEF1 (absoluto)	VEF1 (% do previsto)	VEF1/CVF (absoluto)	VEF1/CVF (% do previsto)	Dco (absoluto)	Dco (% do previsto)
20	3,08	53,4	1,93	50,8	1,82	60,4	94	118,7	11,57	38,7
21	2,04	41,3	1,56	52,3	1,41	59,4	88	110,9	10,3	42,7
22	3,89	61,2	1,91	54,5	1,58	61,4	83	111,7	6,6	22,9
23	6,75	102,4	4,23	105,7	2,72	89,4	64	84	5,16	16,7
24	4,53	72,6	2,35	58,1	2,04	62,2	87	108,1	6,37	19,6
25	4,41	96	2,58	104,9	2,17	117,9	84,1	110,6	12,2	55,3
26	ND	ND	1,69	66	1,41	68,9	83,4	104,4	8,5	37,9
27	ND	ND	2,36	64,9	2,1	76,6	89	117,2	11,6	39,9
28	ND	ND	3,72	85,9	3,18	95	85	110,9	ND	ND
29	3,26	73,4	2,17	90,1	1,79	97,6	82	106,3	12,94	59,3
30	ND	ND	2,35	68,9	2,15	76,4	91	110,4	ND	ND
31	3,28	64,5	2,09	66,8	1,89	75,8	90	113,1	12,41	50,2
32	3,38	65,6	1,64	52,9	1,37	56,3	84	107,3	7,75	31,5
33	3,45	46,5	2,37	52,8	2,08	59,5	88	113,7	ND	ND
34	2,31	49,9	1,36	48,8	1,1	49,1	81	100,9	6,74	28,9
35	4,48	95,4	2,17	74,3	1,91	80,2	88	108,1	12,04	50,5

(Conclusão)

Fonte: Divisão de Pneumologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

Dados obtidos na avaliação funcional pulmonar expressos em valores absolutos e porcentagem do previsto. ND: dado não disponível.

APÊNDICE B – Variantes genéticas identificadas em 35 indivíduos com Pneumonia Intersticial Familiar

Paciente	Sexo	Idade	Comprimento telomérico (percentil)	Polimorfismos			Mutações			
				MUC5B	TOLLIP	TERT	TERT	RTEL1	WRAP53	SHQ1
1	M	35,5	4,6 (< P10)	rs35705950	-	rs2736100	c.2594G>A	-	-	-
2	F	51,6	5,5	rs35705950 (homo)	-	rs2736100	-	c.2299C>T	-	-
3	M	53,5	5,0	-	rs5743890	-	-	c.394C>T	-	-
4	M	49	4,3 (< P10)	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-
5	M	70,7	4,8	-	-	rs2736100 (homo)	-	-	-	-
6	F	64,4	5,4	rs35705950	-	rs2736100	-	-	-	-
7	F	70,5	5,8	rs35705950	-	-	-	-	-	-
8	M	69,3	5,9	-	rs5743890	-	-	-	-	-
9	M	72,8	4,8	rs35705950 (homo)	rs111521887 rs5743894	-	-	-	-	-
10	F	76,7	4,0 (< P10)	-	-	-	c.1730G>A	-	-	-
11	F	89,3	4,9	-	rs5743890	rs2736100	-	-	-	-
12	F	68,2	5,5	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100 (homo)	-	-	-	-
13	M	71,3	5,7	rs35705950	-	-	-	-	-	-
14	M	77,7	6,0	rs35705950	rs111521887 rs5743894 rs5743890	rs2736100	-	-	-	-
15	F	69,7	5,4	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-

(Continua)

APÊNDICE B – Variantes genéticas identificadas em 35 indivíduos com Pneumonia Intersticial Familiar

(Continuação)

Paciente	Sexo	Idade	Comprimento telomérico (percentil)	Polimorfismos		Mutações				
				MUC5B	TOLLIP	TERT	TERT	RTEL1	WRAP53	SHQ1
16	M	65,8	7,4	rs35705950 (homo)	rs111521887 rs5743894	-	-	-	-	-
17	F	70,2	8,1	-	-	-	-	-	-	-
18	F	75,8	6,2	-	rs111521887 rs5743894	-	-	-	-	-
19	M	36	3,4 (< P1)	rs35705950	rs111521887 rs5743894	-	c.2146G>A	-	-	-
20	M	65,5	4,9	rs35705950	rs111521887 rs5743894	-	-	-	-	-
21	F	62,2	6,1	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-
22	M	85,8	4,5	rs35705950 (homo)	rs111521887 rs5743894 rs5743890	rs2736100 (homo)	-	-	-	-
23	M	74,4	4,6	rs35705950	-	rs2736100	-	-	-	-
24	M	55,6	6,6	-	-	rs2736100 (homo)	-	-	-	c.828_831del
25	F	85,4	7,8	-	-	-	-	-	c.1558dupG (homo)	-
26	F	66	5,9	rs35705950	rs111521887 rs5743894 rs5743890	rs2736100	-	-	-	-
27	M	79,5	4,1 (< P10)	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-

APÊNDICE B – Variantes genéticas identificadas em 35 indivíduos com Pneumonia Intersticial Familiar

(Continuação)

Paciente	Sexo	Idade	Comprimento telomérico (percentil)	Polimorfismos		Mutações				
				MUC5B	TOLLIP	TERT	TERT	RTEL1	WRAP53	SHQ1
28	M	65,2	7,0	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-
29	F	81,5	6,1	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-
30	F	42,2	6,8	rs35705950	rs5743890	rs2736100	-	-	-	-
31	F	59,4	6,2	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
32	F	65,7	6,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
33	M	63	7,0	rs35705950	rs5743890	rs2736100 (homo)	-	-	-	-
34	F	61,2	5,6	rs35705950	rs111521887 rs5743894	rs2736100	-	-	-	-
35	F	54,1	6,5	-	rs111521887 rs5743894	rs2736100 (homo)	-	-	-	-

(Conclusão)

Fonte: Laboratório da Divisão de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP.

Variantes genéticas identificadas em 35 indivíduos com Pneumonia Intersticial Familiar. Idade indicada em anos. Comprimento telomérico abaixo de primeiro percentil (< P1) para a idade foi considerado muito curto e entre o primeiro e o décimo percentis (< P10), foi considerado curto; sendo estes indicados na tabela. Comprimento telomérico acima do décimo percentil (P10) foram considerados normais, sem nenhuma descrição adicional na tabela. F: sexo feminino; M: masculino. Homo: variante identificada em homozigose. Hífen (-) indica pesquisa negativa no indivíduos para determinada variante genética. NP: não pesquisado. As posições do DNA são descritas usando as seguintes isoformas: MUC5B e TOLLIP (NC_000011.10); TERT (NM_198253.2 e NC_000005.10); RTEL1 (NM_032957.4); SHQ1 (NM_018130) e WRAP53 (NM_018081).

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo Colaborativo de Aspectos Clínicos e da Patogênese da Fibrose Pulmonar (Colabora-FiP); Diagnóstico precoce da fibrose pulmonar familiar

Pesquisador: Ana Beatriz Hortense

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 31017114.7.1001.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 883.203

Data da Relatoria: 28/10/2014

Apresentação do Projeto:

A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença incomum, de etiologia desconhecida, associada a prognóstico ruim. Existem formas de FPI de incidência familiar. Essa forma da doença é conhecida como fibrose pulmonar familiar (FPF). Estudos no exterior têm identificado alterações genéticas associadas a essa moléstia tais como mutações do gene da proteína C do surfactante (PCS), encurtamentos teloméricos, mutações dos genes TERT e TERC e presença do polimorfismo rs35705950 do gene MUC5B. Nesse contexto, o diagnóstico precoce de familiares ainda assintomáticos pode adquirir importância, principalmente diante do surgimento de novas terapias para a doença. O presente estudo visa investigar em pacientes brasileiros com FPF e em seus familiares a frequência de determinantes genéticos previamente identificados para a doença em estudos realizados no exterior (PCS, TERT, TERC, MUC5B). Além disso, pretende-se investigar a utilidade da dosagem plasmática de proteínas do surfactante e mucinas como biomarcadores de doença pulmonar inicial em familiares assintomáticos. Para tanto serão estudados pelo menos 5 familiares de 10 famílias com casos-índice de FPF. Os familiares deverão ser preferencialmente pais e irmãos, mas também serão investigados tios e primos, independentemente de serem sintomáticos respiratórios ou não.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa do Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual**INSTITUTO DE ASSISTÊNCIA
MÉDICA AO SERVIDOR
PÚBLICO ESTADUAL - IAMSPE** **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo Colaborativo de Aspectos Clínicos e da Patogênese da Fibrose Pulmonar (Colabora-FiP); Diagnóstico precoce da fibrose pulmonar familiar

Pesquisador: MARIANA SILVA LIMA

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 31017114.7.2004.5463

Instituição Proponente: Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual - IAMSPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.508.554

Apresentação do Projeto:

Estudo Colaborativo de Aspectos Clínicos e da Patogênese da Fibrose Pulmonar (Colabora-FiP): Diagnóstico precoce da fibrose pulmonar familiar

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

É possível a detecção precoce do acometimento pulmonar em familiares de pacientes com Fibrose Pulmonar através da pesquisa de determinantes genéticos?

Objetivo Primário:

Identificar em pacientes brasileiros com FPF e familiares as frequências de determinantes genéticos previamente identificados para a doença.

Objetivo Secundário:

Investigar a possível utilidade da dosagem plasmática de proteínas do surfactante e mucinas como biomarcadores de doença pulmonar inicial em familiares assintomáticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como já colocado anteriormente, a quase totalidade dos exames a serem realizados já são parte

Endereço: Rua Pedro de Toledo, 1800 - 14º andar - Ala central - Sala 01

Bairro: Vila Clementino

CEP: 04.039-004

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)4573-8175

Fax: (11)4573-8175

E-mail: cepiamspe@iamspe.sp.gov.br

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduo com Pneumonia Intersticial Familiar

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO COLABORATIVO DA FIBROSE PULMONAR (COLABORA-FIP):
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA FIBROSE PULMONAR FAMILIAR
(PACIENTES)**

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Ana Beatriz Hortense CREMESP: 140142; Telefone: 981549216

Dr. José Antônio Baddini Martinez CREMESP: 43110; Telefone: 36022531

- A) Este é um convite para você participar de uma pesquisa científica chamada Estudo Colaborativo da Fibrose Pulmonar (Colabora FIP): Diagnóstico Precoce da Fibrose Pulmonar Familiar.**
- B) Você foi diagnosticado com uma doença chamada Fibrose Pulmonar Idiopática Forma Familiar (FPF). Essa é uma doença de causa desconhecida sobre a qual a medicina ainda tem muitas dúvidas. Imagina-se que, entre vários fatores, essa doença possa ser causada pelos cigarros ou fatores genéticos.
- C) Estamos fazendo um estudo em vários estados do Brasil para investigar se alterações genéticas estão presentes em pacientes brasileiros com FPF. Também estamos interessados em saber se algumas proteínas estão aumentadas no sangue de pacientes com FPF em comparação ao de pessoas normais.
- D) Caso você concorde em participar do estudo vai ter que responder algumas perguntas de um questionário sobre seus sintomas e seus antecedentes. Você também deverá autorizar o uso para essa pesquisa dos resultados de exames médicos já feitos, ou que você ainda virá a fazer, como parte da avaliação de rotina dessa doença. Esses exames são a tomografia de tórax com cortes de alta resolução, a espirometria, a gasometria arterial e o teste da caminhada dos seis minutos.
- E) Será ainda necessário coletar de uma veia do seu braço aproximadamente 30 ml de sangue para o preenchimento de três tubos de vidro. Esse material será

Versão 2-Modificado em 04/07/2014

2

usado para extração de DNA e separação do plasma. Diversas medidas serão feitas nesse material como, por exemplo, estudo de alterações do gene da proteína C do surfactante, e de outro gene chamado MUC5B.

- F) Os desconfortos provocados pela coleta de sangue são o aperto do braço por um fio de borracha usado para deixar a veia mais visível e pequena dor no momento da entrada da agulha na pele. Pouco frequentemente pode se formar uma mancha arroxeadada no local da entrada da agulha devido ao extravasamento de sangue para debaixo da pele.
- G) Ao longo da duração desse estudo você será acompanhado nos Ambulatórios do HCRP por uma equipe especializada que lhe dará assistência 24 horas por dia. Esta equipe é integrada por médicos da Divisão de Pneumologia do HCFMRP-USP (Tel. 3602-2631). Os médicos diretamente responsáveis pelo seu cuidado serão a Dra. Ana Beatriz Hortense (Tels. 36022631; 981549216) e o Dr. José Antônio Baddini Martinez (Tels. 3602-2531; 99171-2117).
- H) Os membros da equipe responderão qualquer pergunta e darão esclarecimentos para qualquer dúvida surgida sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com os exames.
- I) **Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não a inclusão no estudo, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. Você também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.**
- J) Os membros da equipe se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa em revista médicas e científicas. Quando os resultados da pesquisa forem mostrados em revistas e reuniões científicas o seu nome não vai ser revelado.
- K) Você não terá despesas extras para participar deste estudo, além de ter que vir ao hospital quando chamado.
- L) Você não receberá dinheiro para participar da pesquisa e nem ressarcimentos de despesas com alimentação ou transporte.

3
M) Você tem a garantia de solicitar indenização na Justiça caso se sinta prejudicado pela ocorrência de eventuais danos devidos à pesquisa.

Dados do voluntário

Nome: _____, RG: _____, Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade _____, Telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua participação no estudo. Também afirmamos que uma via deste documento devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do pesquisador responsável

Ana Beatriz Hortense

Telefone para contato: 16-36022631

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do orientador

José Baddini Martinez

Telefone para contato: 16-36022531

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante:

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

**ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido para familiares dos pacientes com
Pneumonia Intersticial Familiar**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO COLABORATIVO DA FIBROSE PULMONAR
(COLABORA-FIP):
DIAGNÓSTICO PRECOCE DA FIBROSE PULMONAR FAMILIAR
(FAMILIARES)**

Pesquisadores Responsáveis:

Dra. Ana Beatriz Hortense CREMESP: 140142; Telefone: 981549216

Dr. José Antônio Baddini Martinez CREMESP: 43110; Telefone: 36022531

- A) Este é um convite para você participar de uma pesquisa científica chamada Estudo Colaborativo da Fibrose Pulmonar (Colabora FIP): Diagnóstico Precoce da Fibrose Pulmonar Familiar.**
- B) Um familiar seu foi diagnosticado com uma doença chamada Fibrose Pulmonar Idiopática Forma Familiar (FPF). Essa é uma doença de causa desconhecida sobre a qual a medicina ainda tem muitas dúvidas. Imagina-se que, entre vários fatores, essa doença possa ser causada pelos cigarros ou fatores genéticos.
- C) Estamos fazendo um estudo em vários estados do Brasil para investigar se alterações genéticas estão presentes em pacientes brasileiros com FPF e seus familiares. Também estamos interessados em saber se algumas proteínas estão aumentadas no sangue de pacientes com FPF e seus parentes em comparação ao de pessoas normais.
- D) Caso você concorde em participar do estudo vai ter que fazer uma série de exames no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Primeiro você vai responder algumas perguntas de um questionário. Depois você deverá fazer uma tomografia de tórax com cortes de alta resolução. Esse exame é um tipo de radiografia mais sofisticado. Para a realização dessas radiografias você vai ficar deitado em um colchão dentro do aparelho enquanto ele vai tirando as chapas. Esse é um exame simples e durante a sua realização não vai haver injeção de contraste ou nenhuma outra substância. Durante a realização desse exame você irá receber doses altas de irradiação, mas o risco de desenvolver câncer ou outras doenças devido a isso é mínimo.

Versão 2-Modificado em 04/07/2014

- E) Nós também pediremos para você respirar em um aparelho que mede a sua capacidade respiratória chamado espirômetro. Você vai colocar a sua boca na máquina, encher o peito de ar até o fim, e depois assoprar todo o ar para fora com força. Algumas pessoas às vezes sentem um pouco de falta de ar ou tontura com esse tipo de esforço.
- F) Será ainda necessário coletar de uma veia do seu braço aproximadamente 30 ml de sangue para o preenchimento de três tubos de vidro. Esse material será usado para extração de DNA e separação do plasma. Diversas medidas serão feitas nesse material como, por exemplo, estudo de alterações do gene da proteína C do surfactante, e de outro gene chamado MUC5B.
- G) Os desconfortos provocados pela coleta de sangue são o aperto do braço por um fio de borracha usado para deixar a veia mais visível e pequena dor no momento da entrada da agulha na pele. Pouco frequentemente pode se formar uma mancha arroxeadada no local da entrada da agulha devido ao extravasamento de sangue para debaixo da pele.
- H) Ao longo da duração desse estudo você será acompanhado nos Ambulatórios do HCRP por uma equipe especializada que lhe dará assistência 24 horas por dia. Esta equipe é integrada por médicos da Divisão de Pneumologia do HCFMRP-USP (Tel. 3602-2631). Os médicos diretamente responsáveis pelo seu cuidado serão a Dra. Ana Beatriz Hortense (Tels. 36022631; 981549216) e o Dr. José Antônio Baddini Martinez (Tels. 3602-2531; 99171-2117).
- I) Os membros da equipe responderão qualquer pergunta e darão esclarecimentos para qualquer dúvida surgida sobre os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com os exames.
- J) Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não a inclusão no estudo, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. Você também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.**
- K) Os membros da equipe se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa em revista médicas e científicas. Quando os resultados da pesquisa forem mostrados em revistas e reuniões científicas o seu nome não vai ser revelado.
- L) Você não terá despesas extras para participar deste estudo, além de ter que vir ao hospital quando chamado.

- M) Você não receberá dinheiro para participar da pesquisa e nem ressarcimentos de despesas com alimentação ou transporte.
- N) Você tem a garantia de solicitar indenização na Justiça caso se sinta prejudicado pela ocorrência de eventuais danos devidos à pesquisa.

Dados do voluntário

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____, bairro _____, cidade _____,
Telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua participação no estudo. Também afirmamos que uma via deste documento devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do pesquisador responsável

Ana Beatriz Hortense
Telefone para contato: 16-36022631
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do orientador

José Baddini Martinez
Telefone para contato: 16-36022531
Assinatura: _____
Data: _____

Dados do participante:

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____
Assinatura: _____
Data: _____

ANEXO E – Termo de consentimento para guarda de material biológico em biorrepositório para todos os participantes**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Eu, José Baddini Martinez, declaro ser responsável pelo biorrepositório Colabora-FIP criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com o objetivo de guardar amostras de sangue, DNA, plasma e soro para investigação de biomarcadores e alterações genéticas relacionadas com o estabelecimento da Fibrose Pulmonar Idiopática, referente aos projetos de pesquisa “Estudo Colaborativo da Fibrose Pulmonar (Colabora-FiP): Aspectos Genéticos e Bioquímicos” e “Estudo Colaborativo de Aspectos Clínicos e da Patogênese da Fibrose Pulmonar (Colabora-FiP): Diagnóstico precoce da fibrose pulmonar familiar”. .

Este material é coletado durante entrevista clínica por meio da retirada de amostra sanguínea em veias do braço. Após coletado e processado o material será guardado congelado em freezer localizado na sala 185 do prédio Anexo A da Faculdade de Medicina de Ribeirão da USP.

Desta forma, gostaria de convidá-lo (a) para guardar amostras de sangue, DNA, soro e plasma suas para fins de pesquisa e análise científica. Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que suas amostras sejam guardadas, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Eu me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso as suas amostras de sangue, DNA, soro e plasma serão identificadas por meio de código com números e letras.

O (a) senhor (a) me passará todos os dados de como posso lhe encontrar e garanto fornecer as informações de seu interesse, bem como dos eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico.

Dados do doador:

Nome: _____, RG: _____, Endereço: _____,
nº _____, bairro _____, cidade _____, telefone _____

Solicitamos sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de que sua amostra de material biológico seja armazenada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, sob a responsabilidade de José Baddini Martinez, para fins de pesquisa e análise científica. Também afirmamos que uma via deste documento devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Ana Beatriz Hortense

Telefone para contato: 16-36022631

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável pelo biorrepositório:

Nome legível: José Baddini Martinez

Telefone para contato: 16-36022531

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante (doador):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável legal pelo doador ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

ANEXO F – Ficha de avaliação clínica padronizada
ESTUDO COLABORA-FIP

DADOS CLÍNICOS

1. NOME DO MÉDICO RESPONSÁVEL _____

2. NOME COMPLETO DO PACIENTE _____

3. ENDEREÇO _____

4. BAIRRO _____ 5. CIDADE _____ 6. CEP _____

7. TELEFONE _____ 8. SEXO: 8.1. Feminino () 8.2. Masculino ()

9. DATA DE NASCIMENTO _____

10. DATA DA COLETA DOS DADOS CLÍNICOS _____

11. MÊS E ANO DA PRIMEIRA QUEIXA ATRIBUÍVEL À DOENÇA _____

12. MÊS E ANO DA PRIMEIRA CONSULTA DEVIDO À DOENÇA _____

13. MÊS E ANO DO DIAGNÓSTICO FINAL _____

14. ESCALA DE DISPNEIA (MRC MODIFICADO)

0	Falta de ar apenas durante exercícios intensos
1	Falta de ar quando andando depressa ou subindo rampa leve
2	Anda mais devagar do que pessoas da mesma idade ou tem que parar para respirar quando andando no plano em seu próprio ritmo.
3	Para para respirar depois de andar menos de 100 metros, ou depois de poucos minutos, no plano.
4	Não sai de casa por causa da falta de ar, ou sente falta de ar para se vestir ou tomar banho.

15. DURAÇÃO DA DISPNEIA _____ Anos () Meses ()

16. TOSSE

16.0 () Ausente.

16.1 () Pigarro matinal ou tosse esporádica na semana.

16.2 () Diária apenas um período no dia, ou < 6 vezes ao dia.

16.3 () Diária > 6 vezes ao dia.

17. DURAÇÃO DA TOSSE _____ Anos () Meses ()

18. EXPECTORAÇÃO

18.0 () Ausente.

18.1 () Pequena quantidade matinal (menos de 15 ml, ou uma colher de sopa ao dia).

18.2 () Média quantidade diária (entre 15-30 ml ao dia, entre uma e duas colheres de sopa ao dia).

18.3 () Grande quantidade diária (mais de 30ml ou duas colheres de sopa ao dia).

19. COR DA EXPECTORAÇÃO

19.0 () Não se aplica (ausente).

19.1 () Branca.

19.2 () Amarelada.

19.3 () Com laivos de sangue.

20. DURAÇÃO DA EXPECTORAÇÃO _____ Anos () Meses ()

21. EPISÓDIOS DE HEMOPTISE 21.0 Não () 21.1 Sim ()

22. CHIADO NO PEITO

22.0 () Ausente.

22.1 () Noturno ou na vigência de quadro infeccioso respiratório agudo.

22.2 () Leve, não impede a atividade física.

22.3 () Moderado, limita parcialmente a atividade física.

22.4 () Intenso, impede a atividade física.

23. DORES ARTICULARES ? 23.0 Não () 23.1 Sim ()

23.3. QUAIS ARTICULAÇÕES ? _____

24. FENÔMENO DE RAYNAULD ? 24.0 Não () 24.1 Sim ()

25. TABAGISMO ATUAL (INTERRUPÇÃO < 6 MESES) ? 25.0 Não () 25.1 Sim ()

25.2. ANOS MAÇO _____

26. TABAGISMO PREGRESSO (INTERRUPÇÃO > 6 MESES) ? 26.0 Não () 26.1 Sim ()

26.2. ANOS MAÇO _____

EXPOSIÇÕES RELEVANTES ?	0. NUNCA	1. PASSADO	2. ATUAL
27. QUIMIOTERÁPIA ANTINEOPLÁSICA			
28. NITROFURANTOÍNA			
29. AMIODARONA			
30. RADIOTERAPIA TORÁCICA			
31. EXPOSIÇÃO A AVES			
32. ÁREAS DE MOFO, BOLOR OU UMIDADE EM CASA OU TRABALHO			
33. APARELHOS DE AR CONDICIONADO			

34. ANTECEDENTE OCUPACIONAL RELEVANTE ? 34.0 Não () 34.1 Sim ()

34.2. CASO POSITIVO, QUAL ? _____

35. BAQUETEAMENTO DIGITAL ? 35.0 Não () 35.1 Sim ()

36. ESTERTORES FINOS ? 36.0 Não () 36.1 Sim ()

DADOS LABORATORIAIS

37. DATA DA ESPIROMETRIA _____

38. PESO _____

39. ALTURA _____

PARÂMETRO	VALORES ABSOLUTOS
40. CPT (Ls)	
41. CVF (Ls)	
42. VEF ₁ (Ls)	
43. VR (Ls)	
44. FEF ₂₅₋₇₅ (Ls/seg)	
45. DLCO ml/min/mmHg	
46. DLCO/VA	

47. DATA DA GASOMETRIA EM AR AMBIENTE _____

PARÂMETRO	VALORES
48. pH	
49. PaO ₂ (mmHg)	
50. PaCO ₂ (mmHg)	
51. H ₂ CO ₃ (mEq/L)	
52. BE (mEq/L)	
53. SaO ₂ (%)	

54. DATA DO TESTE DA CAMINHADA DOS SEIS MINUTOS REALIZADO EM AR AMBIENTE _____

55. DISTÂNCIA PERCORRIDA NO TESTE EM METROS _____

PARÂMETRO	VALORES
56. FC BASAL (bpm)	
57. SaO ₂ BASAL (%)	
58. FC AOS 6 MIN (bpm)	
59. SaO ₂ AOS 6 MIN (%)	
60. MENOR SaO ₂ ATINGIDA (%)	
61. DISTÂNCIA PERCORRIDA (ms)	

62. DATA DA TOMOGRAFIA DE TÓRAX DE ALTA RESOLUÇÃO _____

63. BIÓPSIA A CÉU ABERTO ? 63.0 Não () 63.1 Sim () 63.2 DATA _____

64. DATA DA COLETA DO SANGUE _____