

## Relação entre genótipo e insuficiência pancreática em crianças e adolescentes com fibrose cística de um centro de referência no Brasil

### *Relationship between genotype and pancreatic insufficiency in children and adolescents with cystic fibrosis in a referral center in Brazil*

Fernanda Matos Fontenelle<sup>1</sup>, Márcia Cristina Aquino Teixeira<sup>2</sup>, Edna Lucia Souza<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciência da Saúde/UFBA.; <sup>2</sup> Doutora em Biologia Celular e Molecular- FIOCRUZ, Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Topológicas da Faculdade de Farmácia da UFBA.; <sup>3</sup> Doutora em Medicina e Saúde. Professora Associada IV do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA.

#### Resumo

**Introdução:** fibrose cística (FC) é uma doença genética que culmina em alterações na proteína transmembrana CFTR, resultando na produção de muco mais espesso em diversos órgãos, destacando-se os trato respiratório e digestório. A insuficiência pancreática (IP) acomete até 95% dos pacientes com FC. **Objetivos:** determinar a frequência de IP através da dosagem de elastase fecal-1 (EF-1) e compará-la com o genótipo de pacientes com FC assistidos em um centro de referência. **Metodologia:** foi realizado um estudo transversal, incluindo-se pacientes com FC de 0 a 20 anos. Após a inclusão dos sujeitos à pesquisa, foi realizada consulta ao prontuário para a obtenção de dados clínicos e demográficos e amostras de fezes foram obtidas para dosagem da (EF-1). Os pacientes foram submetidos à análise molecular das mutações por métodos convencionais, através da extração do DNA em sangue periférico. Quando duas mutações patológicas não foram identificadas, o sequenciamento de nova geração com utilização da plataforma *Illumina HiSeq* foi realizado em amostras da mucosa oral. **Resultados:** foram incluídos 31 pacientes, 17 (54,8%) do sexo feminino, mediana de idade de 10 anos, e apenas um paciente foi classificado como branco. Vinte e dois (70,9%) pacientes apresentaram dosagem de EF-1 inferior a 200 µg/g, compatível com o diagnóstico de IP. Destes, 21 (95,4%) apresentaram dosagem de EF-1 menor ou igual a 15µg/g, característica de IP grave. Todos os pacientes com IP apresentavam duas mutações de classes I a III. **Conclusão:** a IP foi identificada em 70% dos pacientes, ocorrendo em todos os pacientes com duas mutações de classe I-III.

**Palavras-chave:** Fibrose cística. Insuficiência pancreática. Elastase pancreática. Genótipo.

#### Abstract

**Introduction:** cystic fibrosis (CF) is a genetic disease that culminates in alterations in the CFTR transmembrane protein, resulting in the production of thicker mucus in various organs, especially the respiratory and digestive tract. Pancreatic insufficiency (PI) affects up to 95% of CF patients. **Objectives:** To determine the frequency of PI by measuring fecal elastase-1 (FE-1) and comparing it with the genotype of CF patients assisted at a referral center. **Methodology:** a cross-sectional study was conducted, including patients with CF from 0 to 20 years. After the inclusion of the subjects to the research, medical records were consulted to obtain clinical and demographic data and stool samples were obtained for the measurement of (FE-1). Patients were submitted to molecular analysis of mutations by conventional methods by DNA extraction in peripheral blood. When two pathological mutations were not identified, next-generation sequencing using the *Illumina HiSeq* platform was performed on oral mucosa samples. **Results:** thirty one patients were included, 17 (54.8%) female, median age 10 years, and only one patient was classified as white. Twenty-two (70.9%) patients had an FE-1 dosage of less than 200 µg / g, compatible with the diagnosis of pancreatic insufficiency (PI). Of these, 21 (95.4%) had an FE-1 dosage less than or equal to 15µg / g, characteristic of severe PI. All patients with two mutations class I to III were PI. **Conclusion:** PI was identified in 70% of patients, occurring in all patients with class I-III mutations.

**Keywords:** Cystic Fibrosis. Pancreatic Insufficiency. Pancreatic Elastase. Genotype

#### INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva, potencialmente letal, mais comum em caucasianos, causada por mutações no gene denominado *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)*, que está localizado no braço longo do cromossomo 7, e é respon-

sável pela codificação da proteína de mesmo nome, que funciona como um canal de cloro na superfície de algumas membranas celulares (ATHANAZIO *et al.*, 2017, KEREM *et al.*, 1989, RIORDAN *et al.*, 1989, ROMMENS *et al.*, 1989). Atualmente, cerca de 85.000 pessoas são afetadas por essa doença, em todo o mundo (DE BOECK *et al.*, 2016). No Brasil, a incidência da FC situa-se em torno de 1:7.000, mas com variação de acordo a região geográfica (RASKIN *et al.*, 2008).

Atualmente, mais de 2.000 mutações já foram descritas no gene *CFTR* (CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE, 2019), as quais são classificadas em sete grupos, de acordo

**Correspondente- Corresponding:** \*Edna Lúcia Souza — Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia. — End.: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador — BA.CEP:40110-100 — Tel: (71) 98822 3326 — E-mail: souza.ednalucia@gmail.com

a funcionalidade da proteína. Nas mutações de classes I, II, III e VII, não há produção da proteína-CFTR, tornando a doença mais grave do que a observada nos pacientes com mutações de classes IV, V e VI, onde existe síntese da CFTR, mas com algum defeito na sua função. Os pacientes podem ser homocigotos ou heterocigotos compostos, com duas mutações diferentes no gene (DE BOECK *et al.*, 2016, PESSOA *et al.*, 2015).

A FC possui um caráter multissistêmico, apresentando um quadro clínico variável e com grande diversidade na gravidade e na evolução clínica (ARIAS LLORENTE; BOUSOÑO GARCÍA; DÍAZ MARTÍN, 2008; WELSH *et al.*, 2001). O fenótipo da FC inclui a elevação de eletrólitos no suor e pode compreender insuficiência pancreática (IP), doenças gastrointestinais e hepatobiliares, além de infertilidade masculina (MAIURI; RAIÁ; KROEMER, 2017, ROSA *et al.*, 2018).

A frequência de IP é de 75% entre os pacientes FC ao nascimento, de 80% a 85%, até o final do primeiro ano, e de 95%, na idade adulta (PINTO; SILVA; BRITTO, 2009; WALI *et al.*, 2012), ocorrendo cerca de 90% de pacientes caucasianos com FC (MEYTS *et al.*, 2002; REIS; DAMACENO, 1998; WELSH *et al.*, 2001). A IP pode ser definida como uma redução da atividade das enzimas pancreáticas em nível abaixo daquele necessário para manter uma digestão normal, culminando em má digestão e má absorção de gorduras, proteínas e carboidratos (LINDKVIST, 2013). Dentre as diversas manifestações clínicas da FC, a IP é a que melhor se correlaciona ao genótipo (KEREM *et al.*, 1989). A mutação mais comum no gene *CFTR*, que mais se correlaciona com a IP, é a F508del. Esta foi a primeira mutação identificada, é a mais frequente mundialmente, presente em 70% dos casos de FC, variando de acordo a população analisada (CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE, 2019).

A avaliação da função pancreática exócrina é um procedimento realizado para pacientes com FC, objetivando determinar a necessidade de reposição das enzimas pancreáticas. O padrão ouro para diagnóstico da IP é a dosagem da elastase fecal- (EF-1), revelado resultados com sensibilidade de 90-100% e especificidade de 96-100% (GONZALES *et al.*, 2011).

Determinar a ocorrência de IP tem grande importância no manejo clínico e na compreensão do prognóstico dos pacientes com FC. Dessa forma, este estudo objetivou determinar a frequência de IP e compará-la com o genótipo de pacientes com FC, assistidos no Ambulatório Multidisciplinar de Fibrose Cística (AMFC) do Complexo Hospitalar Prof. Edgar Santos (Complexo Hupes) da Universidade Federal da Bahia.

## METODOLOGIA

### Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal em uma população com FC acompanhada em um centro de referência de um hospital universitário.

### População

Foram incluídas todas as crianças e adolescentes com idade entre 0 e 20 anos, com diagnóstico confirmado de FC por dois testes do suor positivo (cloro  $\geq 60$  mEq/L) que tivessem realizado o teste de elastase fecal e a pesquisa de mutações patológicas no gene *CFTR*. Pacientes que não tiveram duas mutações identificadas foram excluídos do estudo.

### Protocolo do estudo

Os dados foram coletados no período de março a julho de 2019, a partir de ficha clínica preenchida com os registros dos prontuários médicos. Foram estudadas as seguintes variáveis: idade na admissão ao estudo, sexo, local de residência, mutações no gene *CFTR* identificadas, resultados referentes à dosagem de elastase fecal (EF-1) e terapia de reposição enzimática (TRE).

No período de janeiro de 2015 a setembro de 2016, os pacientes coletaram uma amostra de fezes no domicílio que foi armazenada em geladeira por tempo máximo de 24 horas e transportada em gelo até o AMFC. As amostras foram mantidas sob congelamento a  $-70^{\circ}$  C até o seu transporte para a Faculdade de Farmácia da UFBA, onde se realizou o teste ELISA para a dosagem de EF-1, utilizando-se o kit Elastase Pancreática1 do fabricante ScheBO. A interpretação dos resultados foi realizada, conforme orientações do fabricante como:

- normal:  $> 200 \mu\text{g E1/g}$  de fezes;
- insuficiência pancreática leve a moderada:  $100 - 200 \mu\text{g E1/g}$  de fezes;
- insuficiência exócrina grave:  $< 100 \mu\text{g E1/g}$  de fezes.

No período de janeiro de 2008 até junho de 2019, os pacientes coletaram uma amostra de sangue periférico que foi submetida à análise molecular para a determinação pontual de nove mutações no gene *CFTR*, por métodos convencionais (reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática), no Instituto de Biologia da UFBA. Quando duas mutações no gene *CFTR* não foram identificadas, uma análise secundária por sequenciamento de nova geração foi realizada, para análise de todos os éxons do gene. O sequenciamento foi realizado em um sequenciador Illumina HiSeq, através de uma amostra de swab bucal coletado no AMFC e enviado ao Laboratório Mendelics (São Paulo). A análise das variantes genotipadas foi feita através do alinhamento das sequências do genoma humano (hg19), usando-se BWA-MEM e Genome Analysis Toolkit (GATK), bem como genotipagem algorítmica de variantes de número de cópias (para grandes inserções e duplicações). Anotação e predição de patogenicidade de variantes foram obtidas usando-se o software próprio do Mendelics (Abracadabra).

### Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos,

sob o número 121/2011. Foram assinados por pacientes ou responsáveis, termos de consentimento livre e esclarecido, a depender da faixa etária, e termos de assentimento, quando pertinente.

### Análise estatística

Os dados obtidos foram registrados em questionários padrão e armazenados em um banco de dados no programa Excel. A análise descritiva foi realizada através do cálculo de mediana e frequências simples e relativas das variáveis estudadas. As frequências gênicas foram estimadas de acordo com o método de estimativa de frequências dividindo-se o número total de alelos dos indivíduos da amostra pelo número de alelos mutantes. As mutações no gene *CFTR* foram classificadas em grupos de acordo com suas classes funcionais.

### RESULTADOS

Foram estudadas 36 crianças, mas, cinco foram excluídas por não terem duas mutações no gene *CFTR* identificadas. Dos pacientes incluídos, 17 (54,8%) eram do sexo feminino. A mediana da idade (Min.- Max.) na admissão ao estudo foi de 10 anos (3-20). Apenas um paciente foi classificado como branco; 30 pacientes (96,7%) eram não brancos. Dezenove (61,2%) pacientes residiam no interior da Bahia, 10 (32,2%) em Salvador e zona metropolitana, e dois (6,6%) eram domiciliados em outro estado.

Vinte e dois pacientes (70,9%) tiveram dosagem de EF-1 inferior 200 µg/g, caracterizando a IP. Desses, 21 crianças apresentaram dosagem de EF-1 inferior a 15µg/g, sendo diagnosticada IP grave. Nove (29,1 %) pacientes apresentaram dosagem de elastase fecal maior ou igual a 200 µg/g. Todas as crianças com IP realizavam terapia de reposição enzimática (TRE) durante as refeições diárias, de acordo com o peso. Além disso, duas crianças com EF-1 normal faziam TRE, com base em suas manifestações clínicas.

Quanto ao genótipo, os pacientes foram agrupados de acordo com as classes funcionais das mutações encontradas, sendo G1: pacientes portadores de duas mutações das classes I-III; G2: pacientes portadores de duas mutações das classes IV-VI; G3: pacientes portadores de uma mutação de classes I-III e outra de classes IV-VI e G4 uma ou duas mutações ainda não classificadas. A frequência de IP de acordo com as classes funcionais e as mutações identificadas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1** — Genótipos identificados e agrupamento segundo as classes funcionais, em pacientes com FC acompanhados no AMFC, Salvador, BA, 2019.

| Mutação (classe)   | SP (N=9) <sup>e</sup> | IP(N=22) <sup>e</sup> |
|--|-----------------------|-----------------------|
| <sup>a</sup> G1: I — III   | 0/31                  | 21/31 (67,7%)         |
| <sup>b</sup> G2: IV — VI   | 1/9 (11,1 %)          | 0                     |
| <sup>c</sup> G3: I-III e IV-VI   | 5/9 (55,5 %)          | 0                     |
| <sup>d</sup> G4: I-VI e sem classe definida ou duas mutações sem classe definida | 3/9 (33,3%)           | 1/22 (4,5%)           |

#### Grupos Classes de Mutações:

- a — G1: Pacientes apresentam duas mutações de classes I-III  
 b — G2: Pacientes apresentam duas mutações de classes IV-VI  
 c — G3: Pacientes apresentam uma mutação de classe I-III e outra de classe IV- VI.  
 d — G4: Pacientes apresentam uma ou duas mutações ainda não classificada  
 e — N = número total de pacientes

Fonte: Dados da pesquisa

**Tabela 2** — Frequência do genótipo e a classificação das mutações encontradas no gene *CFTR* em pacientes com FC acompanhados no AMFC, Salvador, BA, 2019.

| Mutação                          | N(%)         | Classe |
|----------------------------------|--------------|--------|
| F508del/F508del                  | 10/31(32,2%) | II     |
| F508del/3120+1G>A                | 6/31(19,3%)  | II/I   |
| F508del/S466X                    | 1/31(3,2 %)  | II/I   |
| F508del/G542X                    | 2/31(6,4%)   | II/I   |
| F508del; 11TG/5T e 10TG/9T       | 1/31(3,2%)   | II/ *  |
| F508del/D1152H                   | 1/31(3,2%)   | II/IV  |
| F508del/3272-26A>G               | 1/31(3,2%)   | II/III |
| G1069R/Y109C; 5T/12TG e 7T/11TG* | 2/31(6,4%)   | II/IV  |
| R1162X/R1162X                    | 1/31 (3,2%)  | IV     |
| Q1100P/Q1100P                    | 1/31(3,2%)   | **     |
| G542X/R334W                      | 1/31(3,2%)   | I/IV   |
| R334W/R334W                      | 1/31(3,2%)   | IV     |
| L206W/A107P                      | 1/31(3,2%)   | II/**  |
| 2307insA/K162E                   | 1/31(3,2%)   | I/***  |
| Q1100P/N1303K                    | 1/31(3,2%)   | **/II  |

\*Polimorfismo

\*\*Essa mutação ainda não tem classe definida

\*\*\*Mutação de significado incerto

Fonte: Dados da pesquisa

### DISCUSSÃO

A IP é a manifestação digestiva mais significativa da FC (GULLO *et al.*, 1977). Constata-se frequência de 75% nos pacientes com FC ao nascimento, de 80% a 85% até o final do primeiro ano, e de 95% na idade adulta. No presente estudo, 70,9 % dos indivíduos foram considerados insuficientes pancreáticos, frequência inferior à indicada na literatura, em caucasianos (PINTO; SILVA; BRITTO, 2009; WALLI *et al.*, 2012). Possivelmente, a raça/etnia da população estudada contribuiu para a menor frequência da IP. Além disso, foi realizado um corte transversal, com dosagem de EF-1 em apenas um momento. Pacientes

suficientes pancreáticos, com o passar do tempo, podem se tornar insuficientes, o que não pôde ser avaliado no presente estudo.

O genótipo tem grande associação com a IP (MOTA; TORALLES; SOUZA, 2016). Os pacientes com suficiência pancreática (SP) possuem pelo menos uma mutação moderada, enquanto pacientes insuficientes pancreáticos são homocigotos ou heterocigotos, possuindo duas mutações de efeito grave (CUTTING, 2005), como foi observado no presente estudo, em que todos os pacientes com duas mutações das classes I-III apresentaram IP.

A F508del foi a mutação mais frequentemente identificada, e sua presença, em homocigose, leva a uma IP grave, como foi observado no presente estudo. Em heterocigose com outra mutação das classes IV-VI, apresenta um quadro mais leve; no entanto, caso a outra mutação seja da classe I-III, o quadro será grave (DAFTARY *et al.*, 2006; KEREM *et al.*, 1989). Neste estudo, 10/31 (32,2%) pacientes apresentam a mutação F508del em homocigose e 6/31 (19,3%) em heterocigose.

No presente estudo, foi utilizado o teste da elastase fecal (EF-1) para diagnóstico da IP. Como é registrado em literatura, é um teste fácil, indireto e disponível para avaliar função pancreática exócrina em crianças (GONZALES *et al.*, 2011). Löser, Möllgaard e Fölsch compararam teste direto com a EF-1 e encontraram 93% de sensibilidade e 93% de especificidade para valores de corte da EF-1 de 200 µg/g de fezes (LÖSER; MÖLLGAARD; FÖLSCH, 1996). Entretanto, esse teste possui algumas limitações, sendo a principal delas a dificuldade no diagnóstico de IP leve a moderada (GONZALES *et al.*, 2011; LINDKVIST, 2013; WALL *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível que os pacientes deste estudo não tenham sido diagnosticados com IP devido às limitações do método. De fato, duas pacientes deste estudo apresentaram valores de EF-1 normais e necessitaram de reposição da enzima.

É importante a aplicação de testes diagnósticos, como a dosagem da EF-1 para início da reposição enzimática, e acompanhamento adequado dos pacientes com IP (BOROWITZ *et al.*, 2004). A EF-1, mesmo com suas limitações, é considerada padrão ouro no diagnóstico de IP, por ser um teste não invasivo. Entretanto torna-se necessária a pesquisa de novos métodos não invasivos que tenham menor custo e possuam elevadas sensibilidade e especificidade, mesmo nos casos de IP moderada, para que haja diagnóstico precoce e tratamento adequado, melhorando, assim, o prognóstico de grande parte dos pacientes com IP.

Este estudo apresenta algumas limitações: o desenho, com apenas um resultado pontual da elastase fecal, número pequeno de pacientes avaliados e realização de apenas uma técnica diagnóstica para determinação da IP.

## CONCLUSÕES

A frequência de IP foi de cerca de 70%, inferior à registrada em pacientes caucasianos com FC. Observou-se associação entre o genótipo e a presença de IP, já que

todos os pacientes com duas mutações consideradas graves foram insuficientes pancreáticos.

## REFERÊNCIAS

- ATHANAZIO, R. A. *et al.* Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 43. n. 3, p.219-245, 2017.
- ARIAS LLORENTE, P. A.; BOUSOÑO GARCÍA, C. B.; DÍAZ MARTÍN, J. J. Treatment compliance in children and adults with cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, Amsterdam, v.7, n.5, p. 359-367, Sept. 2008.
- BOROWITZ, D. *et al.* Use of fecal elastase-1 to classify pancreatic status in patients with cystic fibrosis. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 145, n.3, p. 322-326, 2004.
- CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. **Cystic Fibrosis Foundation**. Testing for cystic fibrosis. 2015. Disponível em: [www.cff.org](http://www.cff.org). Acesso em: 04 July 2019.
- CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE. 2019. Disponível em: [genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html](http://genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html). Acesso em: 25 July 2019
- CUTTING, G. R. Modifier genetics: cystic fibrosis. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, Palo Alto, v. 6, p. 237-260, 2005.
- DE BOECK, K. *et al.* Cystic fibrosis: terminology and diagnosis algorithms. **Thorax**, London, v. 61, p. 627-635, 2006.
- DAFTARY, A. *et al.* Fecal elastase-1: utility in pancreatic function in cystic fibrosis. **J. Cyst. Fibros.**, Amsterdam, v.5, n.2, p.71-76, 2006.
- FARREL, P. M. *et al.* Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: cystic fibrosis foundation consensus report. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 153, p. 1-4, 2008.
- GULLO, L. *et al.* Faecal elastase 1 in children with cystic fibrosis. **Eur. J. Pediatr.**, Heidelberg, v. 156, p. 770-772, 1997.
- GONZALES, A.C.S *et al.* Use of monoclonal faecal elastase-1 concentration for pancreatic status assessment in cystic fibrosis patients. **J. Pediatr.** (Rio J.), Rio de Janeiro, v. 87, n.02, 157-162, 2011.
- KEREM, B. S. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **J. Sci.**, New York, v. 245, p.1073-1080, 1989.
- LINDKVIST, B. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 19, n.42, p. 7258-7266, 2013.
- LÖSER, C.; MÖLLGAARD, A.; FÖLSCH, U. R. Fecal elastase-1: a novel highly sensitive and specific tubeless pancreatic function test. **Gut**, London, v. 42, p. 222-226, 1996.
- MAIURI, L.; RAI, V.; KROEMER, G. Strategy for the etiological therapy of cystic fibrosis. **Cell Death Differ.**, [s.l.], p. 1-20, 2017.
- MEYTS, I. *et al.* Variability of fecal pancreatic elastase measurements in cystic fibrosis patients. **J. Cyst. Fibros.**, Amsterdam, v.1, n. 4, p. 265-268, 2002.
- MOTA, L. R.; TOLLES, M. B. P.; SOUZA, E. L. Manifestações clínicas da mutação F508 del: uma série de casos de pacientes com fibrose cística. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v. 15, n. 3, p. 382-386, set./dez. 2016.
- PESSOA, I. L. *et al.* Fibrose cística: aspectos genéticos, clínicos e diagnósticos. **Bras. J. Surg. Clin. Res.**, [s.l.], v.11, n.4, p. 30-36, 2015.
- PINTO, I. C. S.; SILVA, C.P.; BRITTO, M. C. A. Perfil nutricional, clínico e socioeconômico de pacientes com fibrose cística atendidos em um centro de referência no nordeste do Brasil. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 35, n. 2, p.137-143, 2009.

RASKIN, S. *et al.* Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. **J. Cyst. Fibros.**, Amsterdam, v. 7, n.1, p. 15-22, 2008.

REIS, F. J.; DAMACENO, N. Fibrose Cística. **J. Pediatr. (Rio J)**, Rio de Janeiro, v. 74, supl. 1, p. S76-S94, 1998.

RIORDAN, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. **Science**. New York, v. 245, p. 1066-1073, 1989

ROMMENS, J. M. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: chro-

mosome walking and jumping. **Science**., New York, v. 245, p.1059-1065, 1989.

ROSA, K. M. *et al.* Características genéticas e fenóticas de crianças e adolescentes com fibrose cística no Sul do Brasil. **J. Bras. Pneumol.**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 498-504.2018.

WALI, P. D. *et al.* Comparison of fecal elastase — 1 and pancreatic function testing in children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, New York, v. 54, p. 277-280, 2012.

WELSH, M. J. *et al.* **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8. ed. New York, 2001. p. 5121-5180.

---

**Submetido em:** 04/11/2019

**Aceito em:** 29/11/2019