

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
UNIDADE DE PNEUMOLOGIA INFANTIL

FLÁVIA CRISTINA RODRIGUES

**GENÓTIPO CFTR RARO EM CRIANÇA COM ICTERÍCIA COLESTÁTICA E FIBROSE
CÍSTICA: RELATO DE CASO**

Porto Alegre

Dezembro de 2021

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

UNIDADE DE PNEUMOLOGIA INFANTIL

FLÁVIA CRISTINA RODRIGUES

**GENÓTIPO CFTR RARO EM CRIANÇA COM ICTERÍCIA COLESTÁTICA E FIBROSE
CÍSTICA: RELATO DE CASO**

Trabalho apresentado como requisito parcial para conclusão da residência médica em Pneumologia Pediátrica pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Orientadora: Dra Elenara da Fonseca Andrade Procianoy

Porto Alegre

Dezembro de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Flávia Cristina
GENÓTIPO CFTR RARO EM CRIANÇA COM ICTERÍCIA
COLESTÁTICA E FIBROSE CÍSTICA: RELATO DE CASO / Flávia
Cristina Rodrigues. -- 2021.
16 f.
Orientador: Elenara da Fonseca Andrade Procianoy.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre, Pneumologia Pediátrica,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Fibrose Cística. 2. Regulador de Condutância
Transmembrana em Fibrose Cística. 3. Genótipo. 4.
Fenótipo. 5. Relatos de Casos. I. da Fonseca Andrade
Procianoy, Elenara, orient. II. Título.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	5
RESUMO	6
INTRODUÇÃO	7
RELATO DE CASO	9
DISCUSSÃO	11
BIBLIOGRAFIA	14

LISTA DE ABREVIÇÕES

CFTR - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CIA - comunicação interatrial

FC - fibrose cística

IRT - tripsinogênio imunorreativo

PAS - ácido periódico de Schiff

RESUMO

Fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, causada por mutação no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) que leva a sintomas multissistêmicos. Relatamos o caso de uma menina com FC que apresentou icterícia colestática neonatal, insuficiência pancreática e hipoalbuminemia. O diagnóstico foi confirmado pela identificação de duas mutações CFTR: a mutação F508del e a mutação c.580-2A>C. O caso demonstra a importância de incluir FC como diagnóstico diferencial de síndrome colestática em recém-nascidos e lactentes e contribui com dados clínicos sobre mutação rara do gene CFTR encontrada na paciente.

Palavras-chave: Fibrose Cística; Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística; Genótipo; Fenótipo; Relatos de Caso

INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética causada por mutações no gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), o qual é responsável pela produção da proteína de mesmo nome, que regula a passagem de ânions pela membrana das células epiteliais do organismo. É a doença genética de caráter autossômico recessivo com curso fatal mais frequente em populações de origem caucasiana (1). Estima-se que no Brasil a incidência da doença seja de 1: 10.000 nascidos vivos, tendo 5.417 pacientes cadastrados no Registro Brasileiro de Fibrose Cística de 2018 (2,3).

A proteína CFTR envolvida na doença localiza-se no epitélio secretor do trato respiratório, gastrointestinal, pâncreas e glândulas sudoríparas e sua desregulação leva à alteração no transporte de cloro e bicarbonato, com consequente modificação na absorção de água, causando a produção de secreções mais espessas do que o habitual (4).

O gene CFTR que regula a produção da proteína localiza-se no braço longo do cromossomo 7 e possui cerca de 189.000 pares de base de DNA. Ele possui uma porção codificadora de 27 éxons que será transcrita em RNA mensageiro no núcleo da célula durante uma fase denominada de fase de *splicing*. Após a transcrição do RNA mensageiro este é transportado para o citoplasma da célula onde a proteína é produzida. Em seguida, a mesma é transportada até a região apical, onde fará sua função de atuar como canal de transporte de cloro e bicarbonato. As mutações no gene CFTR podem causar alterações em diversos momentos deste processo, desde erros na síntese da proteína, até alterações em sua função ou estabilidade (5, 6, 7).

Mais de 2000 mutações conhecidas do gene CFTR foram relatadas, as quais podem ser classificadas em 5 categorias de acordo com sua consequência clínica: (1) causadoras de FC, (2) variantes causadoras de distúrbios relacionados ao gene CFTR, (3) variantes de consequência clínica diversa, encontradas tanto em pacientes com FC, quanto em pacientes com distúrbios relacionados ao gene CFTR (4) variantes de significado clínico não comprovado/incerto e (5) variantes sem consequência clínica (8).

Além disso, as mutações também podem ser classificadas de acordo com o defeito que acarretam na proteína CFTR e podem ser divididas em 7 classes funcionais: classe I, onde há redução importante na produção da proteína CFTR, classe II, que leva à um defeito no transporte da proteína até a região apical, acontecendo a degradação precoce da mesma na região do citoplasma, classe III, na qual a proteína está na porção apical da célula, porém sua função de canal de transporte é prejudicada, classe IV, que compromete a condutância do

canal de cloro, reduzindo o número de íons transportados, classe V, que possui proteínas normais, porém em número reduzido, classe VI, onde há a produção de proteínas instáveis, mais facilmente degradadas, e por último, classe VII, que impede a produção do RNA mensageiro e consequentemente da proteína CFTR. Geralmente as mutações de classe II são secundárias a defeito de *splicing* e as mutações de classe III são do tipo *gating* (4,9)

As mutações causadoras de FC levam aos sinais e sintomas multissistêmicos característicos da doença, tais como infecções pulmonares de repetição, dificuldade de ganho pondero-estatural, desnutrição, insuficiência pancreática e doença hepatobiliar (10).

O diagnóstico da FC pode ser realizado desde a triagem neonatal, em pacientes assintomáticos, através da dosagem do tripsinogênio imunorreativo (IRT), confirmado pela dosagem de cloro no suor elevada e/ou identificação de mutações patogênicas no gene CFTR até a realização dos mesmos exames confirmatórios em pacientes com sintomas clínicos sugestivos. Dentre as mutações descritas, a F508del é a mais comum no mundo, com uma frequência que varia de 40 a 83%, conforme a população estudada (1,8, 9,10).

A identificação das mutações do gene CFTR, além de proporcionar a confirmação diagnóstica, nos possibilita um maior entendimento do fenótipo da doença de cada paciente, pois diferentes mutações levam à diferentes desregulações na proteína CFTR, sendo algumas associadas a quadros clínicos mais graves, e outras produzindo sintomas mais brandos ou até mesmo atípicos (11, 12). Porém, até o presente momento, a correlação entre genótipo e fenótipo somente foi identificada na avaliação da insuficiência pancreática, não havendo correlação definida entre as mutações e a gravidade da doença pulmonar.

Casos com mutações raras permanecem sendo um desafio pela necessidade de avaliar a patogenicidade, ou seja, a repercussão clínica da mutação identificada. Relatamos a seguir o caso clínico de paciente com um genótipo CFTR previamente não descrito na literatura médica geral, associado a triagem neonatal negativa e apresentação clínica rara.

RELATO DE CASO

Paciente do sexo feminino, nascida a termo (38 semanas e 2 dias de idade gestacional), via parto vaginal, após gestação sem intercorrências, peso de nascimento: 2260g, filha de pais não consanguíneos, foi encaminhada para nosso serviço aos 69 dias de vida para investigação de colestase.

A menina iniciou com icterícia nas primeiras 48 horas de vida, sendo inicialmente tratada com fototerapia por 3 dias e recebendo alta com o diagnóstico de icterícia fisiológica do recém-nascido. Não havia incompatibilidade sanguínea materno-fetal (tipo sanguíneo materno e da paciente O +).

A triagem neonatal foi coletada no 4º dia de vida, com resultado dentro da normalidade, incluindo dosagem de IRT de 53 ng/mL. A história familiar era positiva para FC devido a irmão falecido por este motivo.

A icterícia reiniciou associada a acolia fecal no 10º dia após o nascimento. Os níveis iniciais de bilirrubina total, direta e indireta eram de 18,90 mg/dL, 10,04 mg/dL e 8,86 mg/dL respectivamente. Avaliação por ecografia abdominal evidenciou heterogeneidade do parênquima hepático, e colangiografia para avaliação anatômica da via biliar não apresentou alterações.

Prosseguiu-se a investigação com realização de duas biópsias hepáticas, observando-se na primeira biópsia presença de alargamento fibroso portal e periventricular, hepatócitos em mosaico (descrito em glicogenoses), além de presença de material positivo na luz dos ductos biliares pela técnica do ácido periódico de Schiff (PAS), compatível com FC e presença de infiltrado linfoplasmocitário e raros neutrófilos, com ductos com rolha biliar e alargamento fibroso portal na segunda biópsia. Após este último procedimento a paciente evoluiu para anasarca e insuficiência ventilatória, necessitando de intubação orotraqueal e ventilação mecânica.

Pela suspeita de FC foi repetida e ampliada a triagem neonatal aos 2 meses de vida, tendo como resultado IRT de 42 ng/ml. Nesta mesma triagem, houve aumento de galactose total e diminuição de vários aminoácidos no teste de cromato de aminoácidos. Também apresentava TSH sérico elevado e diminuição de T4 livre sendo diagnosticada com hipotireoidismo congênito. Pela possibilidade de hiperbilirrubinemia secundária a galactosemia a paciente foi transferida para prosseguir a investigação.

À admissão em nosso serviço, a paciente encontrava-se desnutrida (peso seco de 2,5 kg aos 69 dias de vida), em anasarca e mantinha necessidade de ventilação mecânica por insuficiência ventilatória. Exames laboratoriais realizados: hemoglobina 9,6 g/dL, hematócrito 26,90%, albumina 3,1 g/dL, bilirrubina total 5,1 mg/dL, bilirrubina direta 3,6 mg/dL, bilirrubina indireta 1,5 mg/dL, cloro 108 mEq/L, sódio 147 mEq/L e bicarbonato 29,9 mmol/L.

Novas avaliações revelaram espessamento periportal, sem dilatações biliares, além de aumento do calibre de veia porta à ecografia abdominal. Sorologias para hepatite B, hepatite C, citomegalovírus, epstein-barr e herpes simples foram negativas. A radiografia de tórax evidenciava presença de infiltração e focos de consolidação em lobo superior direito.

Investigação diagnóstica seguiu com sequenciamento do gene CFTR e dosagem de elastase fecal. O sequenciamento foi realizado através de técnica de nova geração, com tecnologia Illumina, utilizando captura de regiões alvo para análise. A investigação de galactosemia através da pesquisa de atividade da enzima Galactose-1-fosfato Uridyl Transferase não foi realizada devido ao uso prévio de hemoderivados para correção de anemia e plaquetopenia. Não foi coletado teste do suor devido à anasarca e instabilidade clínica da paciente.

Evoluiu com distensão abdominal e íleo parálítico, e por esse motivo, associado à suspeita de galactosemia, foi optado por início de dieta a base de aminoácido, medida que levou à melhora progressiva dos sintomas gastrointestinais. Também foi iniciada reposição pré-dietética de enzimas pancreáticas devido a presença de esteatorréia. A redução dos níveis séricos de bilirrubinas e transaminases ocorreu espontaneamente, aos 4 meses de vida.

Houve 4 falhas de extubação devido a erosão posterior da subglote, permanecendo em ventilação mecânica por 25 dias. Recebeu antibioticoterapia de amplo espectro para tratamento de pneumonia e apresentou melhora clínica e radiológica progressiva, tolerando extubação na quinta tentativa. Pela presença de secreção espessa em via aérea e devido à hipótese de FC foi coletada cultura de secreção traqueal, não havendo crescimento de bactérias patológicas, e iniciado tratamento com alfa-dornase na tentativa de facilitar a fluidificação das secreções.

Aos 3 meses de vida recebido exame de sequenciamento do gene CFTR (Laboratório Mendelics), com identificação de duas variantes genéticas em heterozigose: a variante conhecida como F508del e a variante c.580-2A>C. Não encontramos descrição da variante c.580-2A>C na literatura médica geral. Além disso, foi detectado dosagem de elastase fecal baixa compatível com insuficiência pancreática muito grave. Para complementação diagnóstica, foi realizada pesquisa de variantes do alelo Z (alteração que quando presente está correlacionada com doença hepática relacionada à FC), que foi negativa.

DISCUSSÃO

Relatamos o caso de uma paciente com FC e fenótipo clássico caracterizado por sintomas respiratórios associados a secreção espessa das vias aéreas, baixo ganho de peso, insuficiência pancreática e colestase na qual foi identificada uma mutação CFTR rara.

O avanço tecnológico e genético e a possibilidade de realização do sequenciamento do gene CFTR tem permitido a identificação de novas mutações e aumentado a sensibilidade diagnóstica para FC para 99%. Porém, o impacto clínico de uma mutação ainda não descrita deve ser avaliado e, para tal, é necessário a correlação entre os sintomas e o resultado genético (8).

Na paciente relatada, foram encontradas duas mutações no gene CFTR em heterozigose, a mutação F508del e a mutação c.580-2A>C. A mutação F508del é a mais frequentemente encontrada em indivíduos com FC e leva à maturação defeituosa e degradação precoce da proteína CFTR, estando relacionada com a forma clássica da doença (13).

A mutação c.580-2A>C não foi ainda relatada na literatura médica geral e não consta nos bancos de dados dos sites CFTR1 <<http://www.genet.sickkids.on.ca/>>, CFTR2 <“<https://cftr2.org/>”>, Franklin by Genoox <<https://franklin.genoox.com/>> e Clinical Genome Resource <<https://www.clinicalgenome.org/>>. Os bancos CFTR1 e CFTR2 fornecem dados sobre as novas mutações identificadas no gene CFTR, seu significado clínico e as manifestações da FC associadas ao genótipo identificado; os sites Franklin e Clinical Genome são repositórios de informações sobre o genoma humano, que recebem contribuições da comunidade médica mundial, e que, através de ferramentas de inteligência artificial e algoritmos, auxiliam clínicos e pesquisadores na interpretação das variantes identificadas no extenso genoma humano. Entretanto, a variante c.580-2A>C está incluída no site ClinVar <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>, o qual é um arquivo público de livre acesso sobre variantes germinativas e somáticas de qualquer tamanho, tipo ou localização genômica, sendo relatada como patogênica. A submissão da nova mutação foi realizada em 05/11/2018 pelo próprio Laboratório Mendelics. Conforme o último Registro Brasileiro de Fibrose Cística de 2018 existem mais cinco pacientes brasileiros com esta mutação.

A mutação c.580-2A>C leva a um erro no processamento do RNA mensageiro. Durante o processo genômico de produção da proteína CFTR existe uma fase denominada fase de *splicing*, onde o pré-RNA mensageiro é maturado e transformado em RNA mensageiro, que será exportado para o citoplasma para ser traduzido. Nesta fase, há retirada dos íntrons do

pré-RNA mensageiro, permitindo a posterior codificação dos éxons. Acredita-se que 15% das mutações causadoras de doenças são mutações que afetam o splicing do RNA mensageiro (14).

As variantes genéticas podem levar a diferentes erros neste processo de splicing, e na mutação c.580-2A>C há uma alteração na sequência regulatória do RNA mensageiro, ou seja, acontece a substituição de um aminoácido por outro em uma determinada posição do gene, fazendo com que haja codificação incorreta do RNA e produção anômala da proteína CFTR (15, 16). Neste caso, o aminoácido alanina foi substituído pelo aminoácido cisteína em duas posições do RNA mensageiro: posição 580 e posição 2.

Portanto, a soma de um mecanismo molecular que leva à defeito no RNA mensageiro, com as características da região onde o erro é encontrado e a apresentação clínica clássica apresentada pela paciente, indicam que esta variante é patogênica. Em combinação com a presença da mutação F508del, é confirmado o diagnóstico de FC.

Não foi possível concluirmos se as duas variantes se encontram no mesmo alelo, em cis, ou em alelos diferentes, em trans, visto que não foi realizado o sequenciamento genético dos progenitores.

A despeito do diagnóstico genético e da apresentação clínica clássica da paciente, chama atenção os exames de triagem neonatal falso-negativos, a confusão com um possível erro inato do metabolismo, e o quadro importante de colestase, que foi o primeiro sinal apresentado.

No estado do Rio Grande do Sul a triagem neonatal para FC foi instituída no ano de 2012 e segue as recomendações do Programa Nacional de Triagem Neonatal brasileiro, o qual utiliza a dosagem do IRT em duas amostras seguido de dosagem do cloro no suor. A sensibilidade deste método chega a aproximadamente 95%, porém a especificidade é baixa a qual está relacionada ao ponto de corpo (17). Dentre as causas de triagem falso-negativa, as principais são a presença de íleo meconial, coleta tardia da amostra ou amostras submetidas a testes com elevado valor de ponto de corte, e insuficiência pancreática grave (17,18,19). Casos semelhantes ao da paciente, com testes de triagem neonatal falso-negativo e presença de colestase como sintoma inicial já foram relatados previamente (20).

A doença hepatobiliar na FC, que inclui colestase como uma das manifestações clínicas, acontece devido à presença de proteína CFTR nas células dos ductos biliares e não nos hepatócitos. Com a desregulação da proteína, há diminuição do fluxo biliar com consequente espessamento da bile, formação de tampões e obstrução dos ductos biliares. Esta obstrução

leva à impactação de bile nos ductos e ao desenvolvimento de colestase, que posteriormente acarreta inflamação das células estreladas do fígado, com ativação de processo fibroso no local e desenvolvimento de doença hepática em graus variados (21, 22).

Conforme Lindblad, Glaumann, Strandvik, a doença hepatobiliar associada a FC é diagnosticada em até 39% dos pacientes e acontece geralmente no final da primeira década de vida (23). Entretanto, a icterícia colestática pode ser uma manifestação inicial de FC. Estes pacientes, neonatos e lactentes em sua maioria, geralmente não evoluem para doença hepatobiliar e apresentam regressão espontânea do quadro de colestase. Estudo brasileiro de 2017 envolvendo 55 pacientes com FC observou incidência de doença hepatobiliar de aproximadamente 17%, ocorrendo no primeiro ano de vida na maioria dos casos. Os autores acreditam que isto ocorra em pacientes com fenótipos mais graves da doença, hipótese corroborada pela associação com insuficiência pancreática importante e presença de mutações graves do gene CFTR, características também encontradas na paciente relatada (24).

Em conclusão, através deste relato de caso, chamamos atenção para a importância de incluir FC como diagnóstico diferencial de colestase em recém-nascidos e lactentes jovens, mesmo quando testes de triagem neonatal forem negativos. A identificação de uma mutação rara nesta paciente contribui com novos dados na literatura, porém a mesma apresentação pode ser encontrada em pacientes com mutações mais comuns. Não podemos afirmar que exista correlação entre esta variante e o desenvolvimento de colestase.

BIBLIOGRAFIA

- 1- ATHANAZIO, R. A. et al. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 43, n. 3, p. 219–245, 2017.
- 2- PEREIRA, K. D. et al. EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E PERSPECTIVAS DA FIBROSE CÍSTICA EM RECÉM-NASCIDOS E CRIANÇAS NO BRASIL. In: *Saúde Pública e Saúde Coletiva: Dialogando sobre Interfaces Temáticas 2*. [s.l.] Atena Editora, 2019. p. 141–151.
- 3- Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística. Registro Brasileiro de Fibrose Cística. 2018. Disponível em: <http://portalgbefc.org.br/site/pagina.php?idpai=128&id=15>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- 4- MEOLI, A. et al. State of the art on approved cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators and triple-combination therapy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 14, n. 9, p. 928, 2021.
- 5- HANSSENS, L. S.; DUCHATEAU, J.; CASIMIR, G. J. CFTR protein: Not just a chloride channel? *Cells (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 11, p. 2844, 2021.
- 6- ESTABROOKS, S.; BRODSKY, J. L. Regulation of CFTR biogenesis by the proteostatic network and pharmacological modulators. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 2, p. 452, 2020.
- 7- WILMOTT, R. W. et al. *Kendig's disorders of the respiratory tract in children*. 9. ed. [s.l.] Elsevier, 2018.
- 8- BIENVENU, T.; LOPEZ, M.; GIRODON, E. Molecular diagnosis and genetic counseling of cystic fibrosis and related disorders: New challenges. *Genes*, v. 11, n. 6, p. 619, 2020.
- 9- DE BOECK, K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, v. 109, n. 5, p. 893–899, 2020.
- 10- FARRELL, P. M. et al. Diagnosis of cystic fibrosis: Consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *The journal of pediatrics*, v. 181, p. S4- S15.e1, 2017.
- 11- CUTTING, G. R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature reviews. Genetics*, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.

- 12- DRUMM, M. L.; ZIADY, A. G.; DAVIS, P. B. Genetic variation and clinical heterogeneity in cystic fibrosis. *Annual review of pathology*, v. 7, n. 1, p. 267–282, 2012.
- 13- ROSA, K. M. DA et al. Genetic and phenotypic traits of children and adolescents with cystic fibrosis in Southern Brazil. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 44, n. 6, p. 498–504, 2018.
- 14- CAMINSKY, N.; MUCAKI, E. J.; ROGAN, P. K. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Research*, v. 3, p. 282, 2014.
- 15- JOYNT, A. T. et al. Evaluation of both exonic and intronic variants for effects on RNA splicing allows for accurate assessment of the effectiveness of precision therapies. *PLoS genetics*, v. 16, n. 10, p. e1009100, 2020.
- 16- LOPES-PACHECO, M. CFTR modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Frontiers in pharmacology*, v. 10, p. 1662, 2019.
- 17- LUMERTZ, M. S. et al. False-negative newborn screening result for immunoreactive trypsinogen: a major problem in children with chronic lung disease. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, v. 45, n. 3, p. e20180062, 2019.
- 18- DUNN, C. T. et al. The need for vigilance: the case of a false-negative newborn screen for cystic fibrosis. *Pediatrics*, v. 128, n. 2, p. e446-9, 2011.
- 19- SONTAG, M. K. et al. Genetic and physiologic correlates of longitudinal immunoreactive trypsinogen decline in infants with cystic fibrosis identified through newborn screening. *The Journal of pediatrics*, v. 149, n. 5, p. 650- 657.e2, 2006.
- 20- HEIDENDAEL, J. F.; TABBERS, M. M.; DE VREEDE, I. False negative newborn screen and neonatal cholestasis in a premature child with cystic fibrosis. *European journal of pediatrics*, v. 173, n. 12, p. 1581–1583, 2014.
- 21- OLIVIER, A. K.; GIBSON-CORLEY, K. N.; MEYERHOLZ, D. K. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. *Animal models of cystic fibrosis: gastrointestinal, pancreatic, and hepatobiliary disease and pathophysiology. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 308, n. 6, p. G459-71, 2015.

22- TOLEDANO, M. B. et al. The emerging burden of liver disease in cystic fibrosis patients: A UK nationwide study. *PLoS one*, v. 14, n. 4, p. e0212779, 2019.

23- LINDBLAD, A.; GLAUMANN, H.; STRANDVIK, B. Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 30, n. 5, p. 1151–1158, 1999.

24- NASCIMENTO, F. DE S. et al. Hepatobiliary disease in children and adolescents with cystic fibrosis. *Jornal de pediatria*, v. 94, n. 5, p. 504–510, 2018.